

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
(*Origanum vulgare*) SOBRE *Escherichia coli* O157:H7,
Listeria monocytogenes Y *Salmonella spp.* EN LA CARNE DE CUY
(*Cavia porcellus*)”**

TESIS
PRESENTADA POR:
RUTHY SUSANA MAMANI NINA

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PROMOCIÓN: 2013 – II

PUNO – PERÚ
2016

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

TESIS

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
(*Origanum vulgare*) SOBRE *Escherichia coli* O157:H7,
Listeria monocytogenes Y *Salmonella spp.* EN LA CARNE DE CUY
(*Cavia porcellus*)”**

PRESENTADA POR:

RUTHY SUSANA MAMANI NINA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 23 DE DICIEMBRE 2016

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE :
Ph. D. Juan Marcos Aro Aro

PRIMER MIEMBRO :
Ing. M. Sc. Víctor Choquehuanca Cáceres

SEGUNDO MIEMBRO :
Ing. Raúl I. Paucara Ramos

DIRECTOR DE TESIS :
Dr. Alejandro Coloma Paxi

ASESOR DE TESIS :
M. Sc. Oscar D. Oros Butrón

ASESOR DE TESIS :
Dra. Rosario Ortega Barriga

PUNO – PERÚ

2016

Área : Ingeniería y tecnología

Tema : Seguridad, gestión y control en agroindustrias

DEDICATORIA

*A Dios, quien con su infinito amor me ha dado
fortaleza para continuar, quien guía cada uno de
mis pasos, con toda la humildad de mi corazón
puede emanar.*

*A mis queridos padres Leandro y Constantina
quienes han sabido formarme con buenos
sentimientos, hábitos y valores; quienes me
enseñaron a luchar por alcanzar mis metas.*

*A mis hermanos Alexander y David que siempre
han estado junto a mí y brindándome su apoyo; y
mi hermana política Aurelia y a mis sobrinas
Shomara y Melanie.*

*A mis amigos (as) que han estado ahí para
darme ánimos y decirme no estás sola.*

*A mis maestros de la universidad por inculcarme
los diferentes conocimientos que me impartieron
y por los ejemplos de seguir adelante a pesar de
los obstáculos siguen avanzando.*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, en especial a la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial, que gracias a las enseñanzas de sus docentes forman profesionales de gran sabiduría científica y técnica en las ciencias de la Ingeniería Agroindustrial.
- ❖ A mí Director de tesis Dr. Alejandro COLOMA PAXI por haber confiado en mi persona, por disposición y su apoyo incondicional brindado en la realización del presente trabajo.
- ❖ Al Mg. Sc. Oscar OROS por su constante apoyo e incondicional en la realización del presente trabajo desde el inicio hasta la culminación.
- ❖ Al Dra Rosario Edely ORTEGA BARRIGA por sus palabras de aliento, motivadoras y el apoyo del presente trabajo.
- ❖ Al Ph. D. Juan Marcos ARO ARO por su apoyo y orientación.
- ❖ Al Ing. Mg. Sc. Victor Choquehuanca Cáceres por todo su apoyo y orientación.
- ❖ Al Ing. Raul Paucara Ramos por su apoyo y sus palabras de aliento.
- ❖ Finalmente agradezco a toda mi familia por los ánimos y el apoyo que siempre me lo dieron; y todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron en la realización de mi trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	16
I. INTRODUCCIÓN	17
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 ORÉGANO (<i>origanum vulgare</i>)	19
2.1.1 Clasificación taxonómica	19
2.1.2 Aceites esenciales	20
a. Aceite esencial de orégano	20
b. Composición del aceite de orégano	21
2.1.3 Efecto antimicrobiano	21
a. Agentes antimicrobianos de origen natural	22
b. Actividad antimicrobiana del orégano	23
c. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites	25
2.2 EL CUY (<i>Cavia porcellus</i>)	25
2.2.1 Clasificación taxonómica	26
2.3 CARNE	26
2.3.1 Cambios post mortem de la carne y su influencia en la calidad	27
a. La rigidez cadavérica	27

	Pág.
b. La maduración	27
2.3.2 Carne de cuy	28
2.3.3 Valor nutritivo de carne de cuy	29
2.3.4 Microbiología de la carne	29
a. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	32
b. <i>Listeria monocytogenes</i>	32
c. <i>Salmonella spp</i>	33
2.3.5 Conservación de la carne envasado al vacío	34
a. Alteración de la carne mediante envasado al vacío	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	35
3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL	35
3.3 EQUIPOS Y MATERIALES	35
3.3.1 Equipos y materiales	35
3.3.2 Materiales de vidrio	36
3.3.3 Reactivos e insumos	37
3.3.4 Medios de cultivo	37
3.3.5 Otros materiales	37
3.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	38
3.4.1 Preparación y conservación de cepas bacterianas	39
3.4.2 Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del orégano (<i>Origanum vulgare</i>) sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp</i> .	39
a. Solución estándar o madre	40

	Pág.
b. Preparación del inóculo	40
c. Procedimiento	40
d. Lectura e interpretación	41
3.4.3 Preparación de la carne de cuy fresca con adición del aceite esencial de orégano	41
3.4.4 Evaluación microbiológica de la carne de cuy con aceite esencial de orégano.	41
a. Enumeración de <i>Echerichia coli</i> O157:H7, en la carne de cuy con aceite esencial	41
b. <i>Listeria monocytogenes</i> en la carne de cuy con aceite esencial	42
c. <i>Salmonella spp.</i> en la carne de cuy con aceite esencial	43
3.4.5 Reacción cinética básica para determinar la pérdida de la calidad de los alimentos	44
3.4.6 Diseño estadístico	45
a. Evaluación de la carne de cuy fresca en diferentes concentraciones con adición del aceite esencial de orégano	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
4.1 Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp</i>	46
4.2 Evaluación de la concentración del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) durante el tiempo de almacenamiento en el crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp</i> en la carne de cuy (<i>Cavia porcellus</i>)	48

	Pág.
4.2.1 Evaluación del pH	48
a) <i>Listeria monocytogenes</i>	48
b) <i>Salmonella spp</i>	50
c) <i>Escherichia coli</i> O157:H7	51
4.2.2 Evaluación de los análisis de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en las muestras de las carnes de cuy tratada con aceite esencial de orégano	53
a) Evaluación de <i>Listeria monocytogenes</i>	53
b) Evaluación de <i>Salmonella spp</i>	56
c) Evaluación de <i>Echerichia coli</i> O157:H7	60
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	76

ÍNDICE DE TABLAS

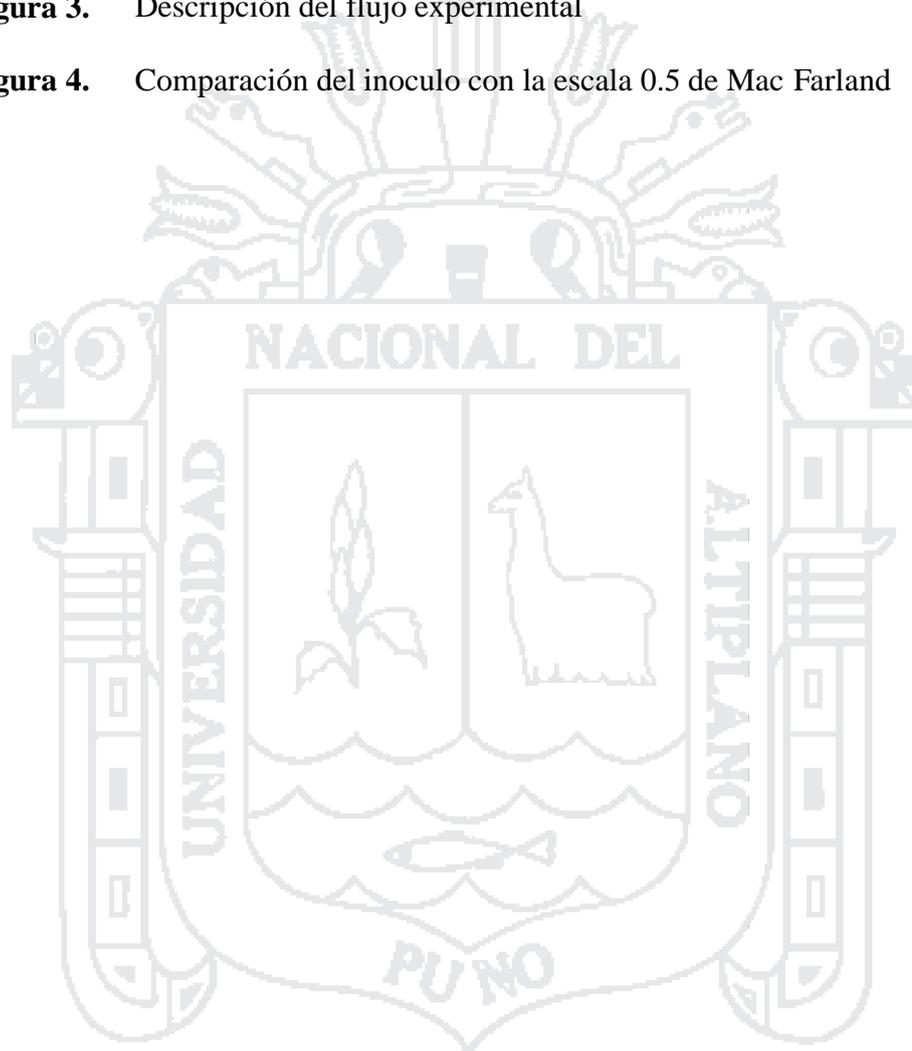
	Pág.
Tabla 1. Composición del aceite esencial 1.3 ml de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) de acuerdo a cromatografía de gas con detector de masa	22
Tabla 2. Extractos y aceites presentes en plantas, considerados GRAS por la FDA	23
Tabla 3. Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana.	25
Tabla 4. Disminución del pH en la carne luego de la faena (post-mortem) como indicador de la calidad	28
Tabla 5. Composición química nutricional de la carne de cuy fresca (100 g).	29
Tabla 6. Composición comparativa de productos cárnicos	30
Tabla 7. Rango de condiciones que permiten crecimiento de <i>Salmonella spp</i>	33
Tabla 8. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano sobre cepas bacterianas	46
Tabla 9. Valores de pH en la carne de cuy (<i>Listeria monocytogenes</i>) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo de almacenamiento	49
Tabla 10. Valores de pH en la carne de cuy (<i>Salmonella spp</i>) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo de almacenamiento	51
Tabla 11. Valores de pH en la carne de cuy (<i>Escherichia coli</i> O157:H7) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo de almacenamiento	52

	Pág.
Tabla 12. Recuento microbiano de <i>Listeria monocytogenes</i> viable de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en log ufc/g	54
Tabla 13. Recuento microbiano de <i>Salmonella spp</i> de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en log ufc/g	57
Tabla 14. Recuento microbiano de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 viable de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en log ufc/g	60
Tabla 15. Valores de K y tiempos de vida estimada para carne de cuy en función a los valores de la carga microbiana log ufc/g	63
Tabla 16. Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7	84
Tabla 17. Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre <i>Salmonella spp</i>	85
Tabla 18. Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	85
Tabla 19. ANVA del pH de la carne de cuy con <i>Listeria monocytogenes</i> .	91
Tabla 20. Prueba de comparación Duncan para del pH de la carne de cuy (<i>Listeria monocytogenes</i>) con respecto a los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento	92
Tabla 21. ANVA del pH de la carne de cuy con <i>Salmonella spp</i>	93

	Pág.
Tabla 22. Prueba de comparación Duncan del pH de la carne de cuy (<i>Salmonella spp</i>) con respecto a los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento	94
Tabla 23. ANVA del pH de la carne de cuy con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	95
Tabla 24. Prueba de comparación Duncan del pH de la carne de cuy (<i>Escherichia coli</i> O157:H7) con respecto a los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento	96
Tabla 25. ANVA de <i>Listeria monocytogenes</i> presente en la carne de cuy con AE	97
Tabla 26. Prueba de comparación Duncan de <i>Listeria monocytogenes</i> presente en la carne de cuy con AE con respecto a los tratamientos a través del tiempo	98
Tabla 27. ANVA de <i>Salmonella spp</i> presente en la carne de cuy con AE	99
Tabla 28. Prueba de comparación Duncan de <i>Salmonella spp</i> presente en la carne de cuy con AE con respecto a los tratamientos a través del tiempo	100
Tabla 29. ANVA de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 presente en la carne de cuy con AE	101
Tabla 30. Prueba de comparación Duncan de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 presente en la carne de cuy con AE con respecto a los tratamientos a través del tiempo	102

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de los principales componentes del orégano	24
Figura 2. Factores que influyen en la calidad de la carne	31
Figura 3. Descripción del flujo experimental	38
Figura 4. Comparación del inoculo con la escala 0.5 de Mac Farland	83

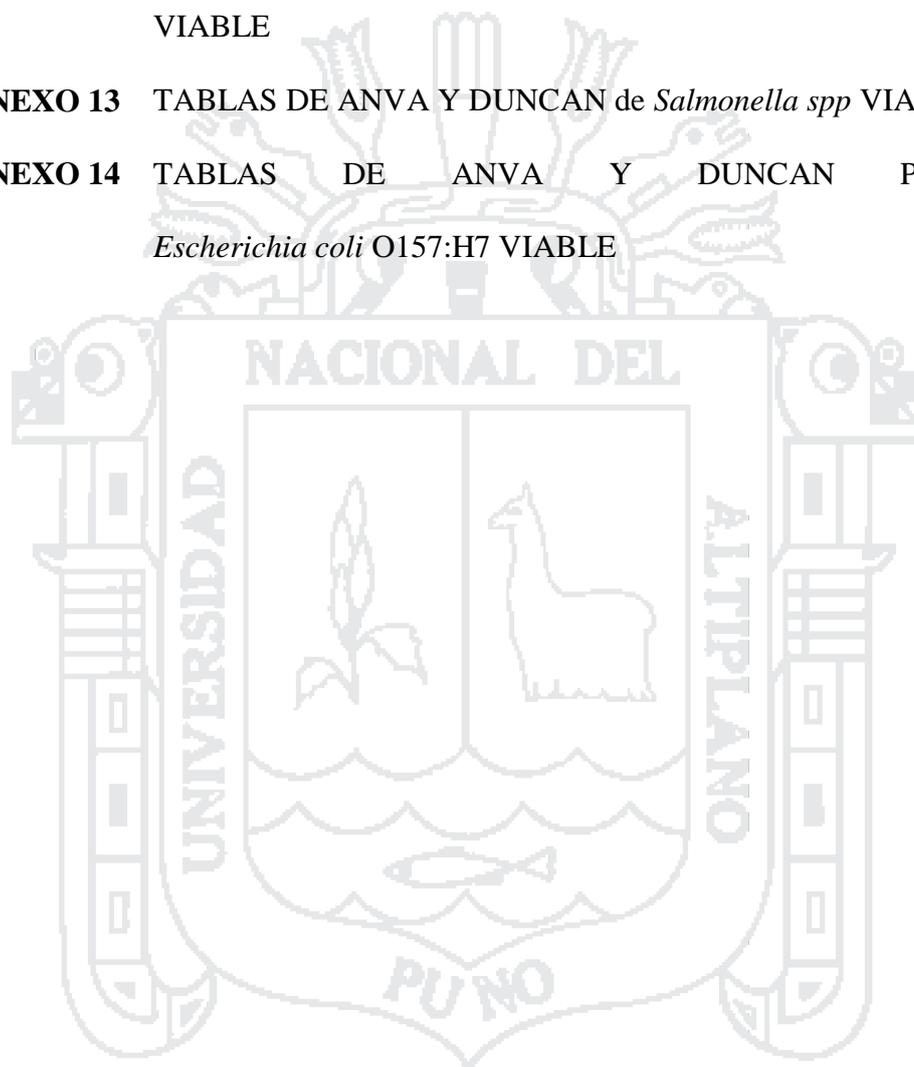


ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 PANEL FOTOGRÁFICO DE CONSERVACIÓN DE CEPAS <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> Y <i>Salmonella spp</i>	77
ANEXO 2 PANEL FOTOGRÁFICO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AE DE ORÉGANO SOBRE <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> Y <i>Salmonella spp</i>	78
ANEXO 3 PANEL FOTOGRÁFICO DEL TRATAMIENTO CON ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>), EN LA CARNE DE CUY	80
ANEXO 4 PANEL FOTOGRÁFICO DE RECuento VIABLE DE <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> Y <i>Salmonella spp</i>	81
ANEXO 5 Comparación del inoculo con la escala 0.5 de Mac Farland	83
ANEXO 6 RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA SOBRE CEPAS <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp</i>	84
ANEXO 7 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE pH	86
ANEXO 8 FIGURAS DE BACTERIAS PATOGENAS	89
ANEXO 9 TABLAS DE ANVA Y DUNCAN DEL pH (<i>Listeria monocytogenes</i>)	91
ANEXO 10 TABLAS DE ANVA Y DUNCAN DEL pH (<i>Salmonella spp</i>)	93

Pág.

ANEXO 11	TABLAS DE ANVA Y DUNCAN DEL pH (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	95
ANEXO 12	TABLAS DE ANVA Y DUNCAN de <i>Listeria monocytogenes</i> VIABLE	97
ANEXO 13	TABLAS DE ANVA Y DUNCAN de <i>Salmonella spp</i> VIABLE	99
ANEXO 14	TABLAS DE ANVA Y DUNCAN PARA <i>Escherichia coli</i> O157:H7 VIABLE	101



ABREVIATURAS

%	: Porcentajes.
°C	: Grados Celsius.
AE	: Aceite Esencial.
FDA	: Food and Drug Administration.
GRAS	: Generally Recognized as Safe.
PSE	: Carne Pálida, Blanda y Exudativa.
DFD	: Carne Oscura, Firme y Seca.
CLSI	: Clinical and Laboratory Standars Institute.
DCA	: Diseño Estadístico Completamente al Azar.
ANVA	: Análisis de Varianza.
ETAS	: Enfermedades de Transmisión Alimentaria.
ufc	: Unidades formadoras de colonias.
CMI	: Concentración Mínima Inhibitoria.
AFNOR	: Asociación Francesa de Normalización.
UI	: Unidad Internacional.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* en la carne de cuy (*Cavia porcellus*). El proceso de la investigación inició con la búsqueda de la Concentración Mínima Inhibitoria de AE de orégano, por el método de macro dilución en caldo Muller Hinton e incubado a 37°C por 24 horas para realizar la lectura del resultado en las bacterias tratadas en cuatro repeticiones por cada concentración. Posteriormente en muestras de carne de cuy se inoculó 4.00 log ufc/g de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* por separado, utilizando una muestra control y 3 concentraciones de AE de orégano (al 0.4%, 0.8% y 1.2% del peso de la muestra de carne de cuy) almacenados a 4°C; para realizar el recuento viable de las muestras tratadas, se realizó conteos cada dos días durante el tiempo de almacenamiento de 12 días como período máximo de estudio. La CMI de AE de orégano con mayor efecto y por promedio aritmético de las 4 repeticiones por cada muestra indica, que la concentración con mayor efecto inhibitorio para *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* fue de 3.5, 1.5 y 2.5 µg/ml respectivamente. En las muestras de carne de cuy inoculadas con las bacterias ya mencionadas, tratadas con 3 diferentes concentraciones de AE de orégano resultó: con mayor efecto inhibitorio en *E. coli* O157:H7 y *Salmonella spp* partir del día 6 y 8 respectivamente, en las concentraciones de 0.8 y 1.2 % en ambos casos, mientras para *L. monocytogenes* el mayor efecto inhibitorio resultó a partir del día 10 con la concentración de 1.2%; durante 12 días de almacenamiento se observó una reducción del crecimiento bacteriano en 75% de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella spp*. A partir de los resultados obtenidos se concluye que el AE de orégano presenta buena actividad antimicrobiana y un efecto inhibitorio durante el tiempo de 12 días almacenamiento de la carne de cuy.

Palabras claves: Aceite esencial de orégano, carne de cuy, antimicrobiano, concentración mínima inhibitoria.

I. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es un tema cada vez más importante, en la salud pública y en la conservación de productos alimentarios, debido a los últimos años por brotes de enfermedades transmitidas por alimentos han impulsado una búsqueda de formas innovadoras para inhibir el crecimiento microbiano en alimentos (Ochoa *et al.*, 2011) por lo tanto las toxiinfecciones alimentarias provocadas por los microorganismos patógenos de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, tienen una gran importancia en países desarrollados por el gran número de personas infectadas y por la industrialización de alimentos que favorecen la diseminación de patógenos. *Escherichia coli* O157:H7 es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos, se conoce hoy en día la mayoría de los casos de síndrome urémico hemolítico son ocasionados por este microorganismo (Marzocca *et al.*, 2006). *Listeria monocytogenes* es el microorganismo patógeno responsable de la listeriosis, enfermedad transmitida por los alimentos de carácter grave a pesar de presentarse con baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAS más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias (Schöbitz, Ciampi, & Nahuelquin, 2009). La salmonelosis es una enfermedad transmitida por los alimentos por lo general asociados con el consumo de alimentos de origen animal (Coma, 2001), la infección por *Salmonella spp.* está asociada por la ingestión de alimentos preparados o manipulados inapropiadamente o previamente contaminados.

Los aceites esenciales tienen como ventaja, que son obtenidos de material vegetal que se encuentran en hojas, corteza o frutos de la misma planta que han sido consumidos históricamente como alimentos de uso común y han sido utilizadas como condimentos de sabor en los alimentos por su potencial, como agentes naturales para la conservación de alimentos (Rea, 2011); en el aceite esencial de orégano se identificó pequeños terpenoides

y compuestos fenólicos tales como carvacrol y timol (Oussalah *et al.*, 2007). El uso de antimicrobianos (conservadores) es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente, redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones, en esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados (Rodríguez, 2011).

Las carnes son las fuentes más probables de infección o de contaminación, (Durango, Arrieta, & Mattar, 2004) por lo tanto la carne de cuy es un producto alimenticio que representa un potencial, por su alto valor nutricional en contenido de proteínas y escaso nivel en colesterol hacen que la carne de cuy sea muy apreciada para el consumo humano local y extranjero; esto implica mantenerlos en estado fresco refrigerado, cual resulta difícil mantener la carne en estado fresco por la proliferación de bacterias y la contaminación de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*, que se encuentran en el tracto intestinal de los animales que son contaminantes durante el beneficio del animal, en muchos casos suele ocurrir una contaminación cruzada y proliferarse restando la inocuidad de la carne, consecuentemente un riesgo para la salud del consumidor, por esta causa se planteó los siguientes objetivos.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*.
- Determinar el efecto de la concentración del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) durante el tiempo de almacenamiento en el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*. en la carne de cuy (*Cavia porcellus*).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

Es una hierba perenne aromática del genero *Origanum vulgare*, muy utilizada en la cocina mediterránea. La planta forma un pequeño arbusto achaparrado de unos 45 cm de alto, los tallos, que a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores; las hojas salen opuestas, ovales y anchas de entre 2-5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados y con vello en el envés; las diminutas flores de color blanco o rosa, que nacen en apretadas inflorescencias terminales muy ramificadas están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo (Collura & Storti, 1971).

El orégano (*Origanum vulgare*) es una hierba aromática y medicinal promisorio futuro en la agro exportación peruana; su valor comercial está influenciado grandemente por el contenido de aceite esencial y oleoresina que posee (Albado, Saez, & Grabiell, 2001).

2.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica es: (Moreno, 1989); (Collura & Storti, 1971).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género : *Origanum*

Especie: *vulgare*

Nombre binomial: *Origanum vulgare*

Nombre común: Orégano

2.1.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos oleosos que se obtiene a partir de diferentes partes de las plantas como: flores, brotes semillas, hojas, ramitas corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Burt, 2007). Se puede extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enflorado o enfleurage y con fluidos supercríticos (Martinez, 2001). La presencia de determinadas moléculas es afectado por el tipo de extracción, la cual dependerá del propósito en el uso del producto (Angioni *et al.*, 2006) .

Los aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana frente a un amplio de microorganismos, como por ejemplo: bacterias responsables del deterioro o patógenos transmitidas por alimentos (Vargas *et al.*, 2011). Los principales componentes de los aceites esenciales de plantas, hierbas y especias responsables del efecto antimicrobiano son los compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides (Tiwari *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales se utilizan como aromatizantes en alimentos; perfumería (fragancias); productos farmacéuticos (por sus propiedades funcionales), también se emplean como selladores dentales, antisépticos, por ser antibacterianos, anti fúngicos y antivirales (Burt, 2007).

a. Aceite esencial de orégano

El aceite esencial del *Origanum vulgare*, es un líquido de color amarillo de agradable aroma, que se puede observar en el interior de las flores y en las hojas y cuya composición química es bastante compleja y entre los más importantes constituyentes podemos numerar: timol, carvacrol, pineno, cymol, selineno, dipenteno, α -terpineno, terpenos

varios, algunos ácidos polifenólicos como ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido ursólico, ácido clorogénico, taninos, principios amargos, algunos flavonoides como el lutenol, diosmetol, kaemferol y derivados de apigenol. Sin duda que el componente mayoritario es el carvacrol (80,2%). Relevante es la importancia que se le ha encontrado en farmacología por su actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral, y diurética suave (Camus & Trujillo, 2011).

b. Composición del aceite de orégano

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que pueden contener sobre 20 - 60 componentes en concentraciones muy diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes en concentraciones bastante altas (20 - 70%) comparadas con otros componentes presentes. Los componentes mayoritarios pueden constituir más del 85% del aceite esencial y son generalmente los que determinan las propiedades biológicas (García, 1988). En el Tabla 1 se presenta la composición del aceite esencial de orégano
rendimiento % de aceite esencial 1.3 ml.

2.1.3 Efecto antimicrobiano

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe principalmente por la presencia de compuestos fenólicos (carvacrol, timol, eugenol, etc.) presentes en ellos. Los aceites esenciales con mayor actividad antimicrobiana son aquellos que proporcionan compuestos fenólicos en mayor cantidad (Burt, 2007).

Las propiedades antimicrobianas de las especias se han conocido durante siglos, por ejemplo la canela, el comino y el tomillo se emplearon en el antiguo Egipto asimismo, las especias en la antigua India y China se empleaban para conservar alimentos, como también con fines medicinales (Hirasa & Takemasa, 2002).

Tabla 1. Composición del aceite esencial 1.3 ml de orégano (*Origanum vulgare*) de acuerdo a cromatografía de gas con detector de masa.

COMPUESTOS	%
<i>Phellandreneos</i>	1.75
<i>p-cymenecoccus aureus</i>	6.86
<i>trans-sabinene hydrate</i>	3.53
<i>Linalool</i>	1.47
<i>Cis sabinene hydrate</i>	18.66
<i>4-terpineol</i>	9.43
<i>Terpineol</i>	2.76
<i>Linalyl acetate</i>	7.4
<i>Thymyl-metyl-eter</i>	1.52
<i>Thymyl-metyl-eter</i>	2.07
<i>Carvacrol</i>	7.72
<i>Carvacrol</i>	1.18
<i>Trans-caryophyllene</i>	2.76
<i>Spathulenol</i>	2.26
<i>caryophyllene oxide</i>	2.21
<i>palmitic acid</i>	8.39
<i>9,12-octadecadienoic acid</i>	8.29
<i>9,12,15.octadecatrienal</i>	5.08
<i>2-methyl-hexanal</i>	1.74
<i>2-dodecanona</i>	2.52
<i>1,3,3-trimethyl-2-(3-methyl-2-methylene 3-buthylene-3-butenylidene) ciclohexanol</i>	2.4

Fuente: Albado, Saez, & Grabiell, (2001).

a. Agentes antimicrobianos de origen natural

Dentro de los compuestos naturales con actividad antimicrobiana ha sido reconocida la efectividad que presentan los aceites esenciales (Martinez, 2001). Con respecto a estos compuestos, la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR), los

define como “aquellos productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal por destilación por arrastre con vapor, por procedimientos mecánicos, entre otros, con el fin de separar la fase acuosa” (Bermudez, 2009). Se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios componentes de aromas volátiles pertenecientes a diferentes clases de compuestos orgánicos tales como: hidrocarburos alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles (Zekaria, 2007), los cuales son los responsables del aroma característico de las esencias.

La FDA (Food and Drugs Administration), considera a los agentes antimicrobianos de origen natural, como sustancias del tipo GRAS (Generally Recognized as Safe), es decir que no presentan ningún riesgo para la salud de las personas. Dentro de la amplia gama de aceites esenciales con actividad antimicrobiana las oleorresinas y extractos naturales, obtenidos de productos vegetales (Tabla 2).

Tabla 2. Extractos y aceites presentes en plantas, considerados GRAS por la FDA.

Nombre Científico	Nombre Común	Parte	Aceite esencial
<i>Cinnamomun verum</i>	Canela	Hojas	Cinamaldehído
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Hojas	Carvacrol
<i>Syzygium oromaticum</i>	Clavo de olor	Corteza, hojas	Eugenol
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Flor, hojas	Timol
<i>Eucaliptus globulus</i>	Eucalipto	Hojas	Cineol

Fuente: Zekaria, (2007).

b. Actividad antimicrobiana del orégano

Existen muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, que son indicados como bactericidas e insecticidas, los cuales presentan actividad antimicrobiana comparable, o incluso mayor, que los compuestos típicamente utilizados para estos propósitos (Bastos *et al.*, 2011) . En la Figura 1 se observa la estructura química de los componentes de orégano.

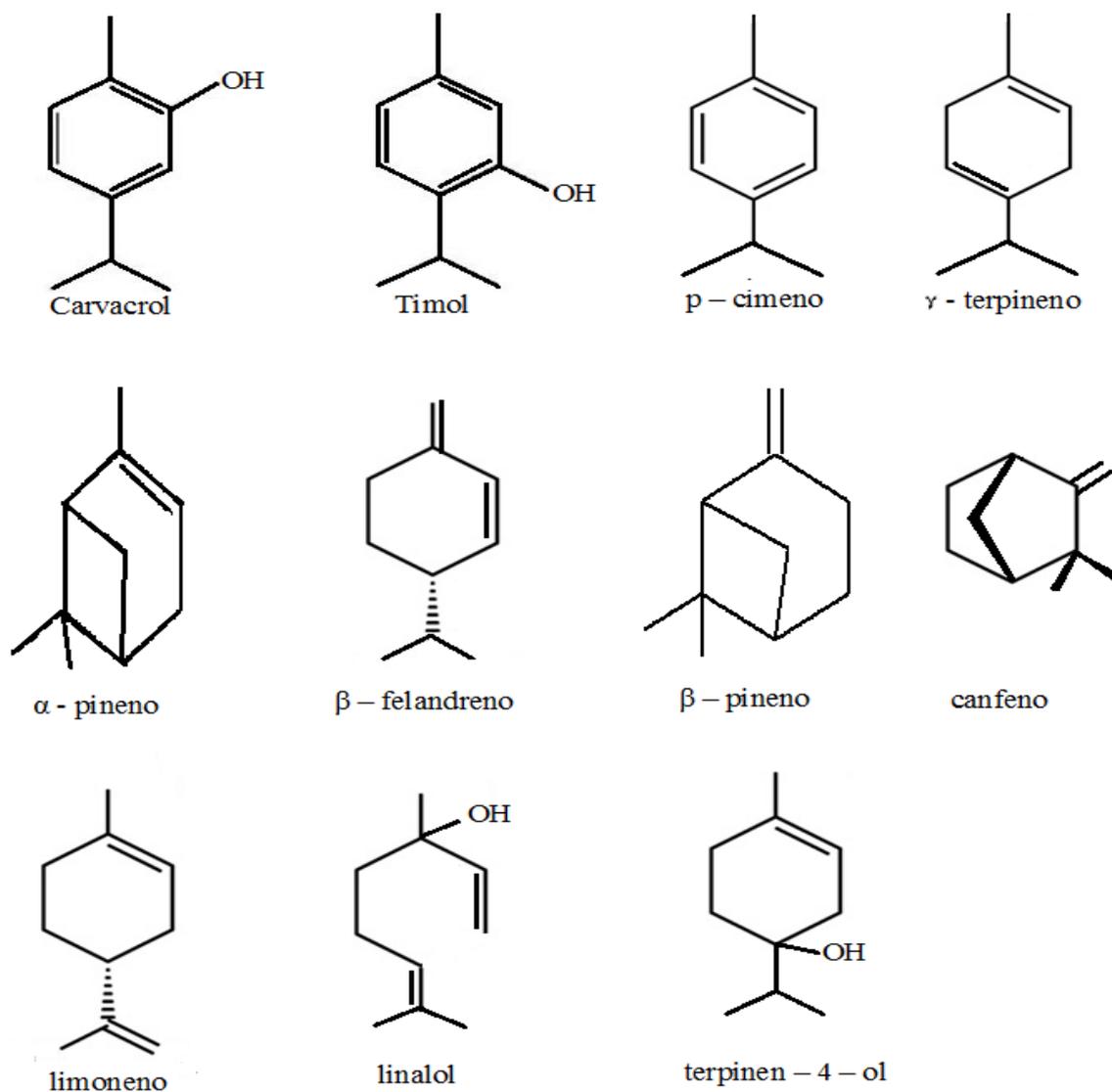


Fig. 1. Estructura química de los principales componentes del orégano (Arcila *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativo: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis, Kalpoutzakis, & Mitaku, 2001). En el caso de *Escherichia coli* O157:H7 existe una relación concentración efecto a 625 ml/l con

actividad bactericida después de 1 minuto de exposición al aceite, mientras que después de 5 minutos se requirieron 156 y 312 ml/l. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha informado que las células que crecen en concentraciones sub-letales de carvacrol, sintetizan los fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales (Reinders & Burt, 2003).

c. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites

Los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana están clasificados en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía (Stella & Marín, 2009). En la Tabla 3 se muestra métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 3. Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana.

Método	Categorías	CMI µg/ml
Difusión en agar (discos)	S, I, R	No
Dilución en caldo	S, I, R	Si
Métodos automatizados	S, I, R	Si
E-test	S, I, R	Si

S: Susceptible; I: Intermedio; R: Resistente; CIM: Concentración Mínima Inhibitoria.

Fuente: Stella, & Marín (2009).

2.2 EL CUY (*Cavia porcellus*)

El cuy (*Cavia porcellus*) también conocido como: cobayo, curi, conejillo de indias o guinean pigs, es un roedor originario de la región andina de América que es ancestralmente la base proteica animal de la dieta de los pobladores rurales (Fernández, 2007). Empleado como mascota, animales de experimentación y productor de carne para

el consumo humano. La piel se puede utilizar en la industria del curtido y la materia fecal con el orín, forma un excelente abono orgánico (Argote, 1999).

2.2.1 Clasificación taxonómica

El cuy está dentro de la siguiente clasificación zoológica (Moreno, 1989).

Reino: Animal

Sub-reino: Metazoarios

Tipo: Vertebrados

Clase: Mamíferos

Sub-clase: Placentarios

Orden: Roedores

Sub-orden: Hystricomorpha

Familia: Caviidae

Género: *Cavia*

Especie: *Cavia porcellus Linnaeus*

2.3 CARNE

La carne es el tejido muscular de los animales que es utilizado como alimento por los seres humanos, proporcionando altos niveles de proteína, minerales esenciales (como hierro, selenio, zinc), vitaminas del grupo B (excepción del ácido fólico) y aminoácidos esenciales como Lisina, Treonina, Metionina y Triptófano (Ramos, 2014). La carne es uno de los alimentos básicos de la humanidad, desde sus orígenes; con los cereales constituyen la fuente de nutrientes de mayor consumo, aportando proteínas de muy buena calidad, vitaminas y calorías (Primo, 1998).

Estructuralmente la carne está constituida por fibras musculares; células multinucleadas, largas y delgadas que se unen entre sí, por medio de tejido conjuntivo. Cada fibra muscular está rodeada por una membrana celular, el sarcolema, en cuyo

interior están contenidas las miofibrillas complejas de las dos principales proteínas musculares, la actina y la miosina (Alcazar, 2002).

2.3.1 Cambios post mortem de la carne y su influencia en la calidad

Después del sacrificio se producen dos fenómenos en el músculo: la *rigidez cadavérica* (*rigor mortis*) y la *maduración*.

a. La rigidez cadavérica

Cuando el animal es desangrado, comienza el proceso metabólico anaeróbico; del sistema enzimático del mismo sigue demandando ATP que en ausencia de oxígeno, se forma a partir del glucógeno de reserva, por la glicolisis productora de ácido pirúvico, el cual no se oxida a través del ciclo tricarbónico, sino que se reduce a ácido láctico (Primo, 1998).

La rigidez e inestabilidad del músculo es responsabilidad de una unión irreversible de las proteínas contráctiles del sarcolema de la carne: La actina y la miosina. Como está presente la glicólisis anaerobia, la cantidad de ATP formado es insuficiente para separar estas dos proteínas (Ramos, 2014).

b. La maduración

Tras el periodo de “rigor”, se mantiene la carne a temperatura de refrigeración y se produce la pérdida de contracción y el ablandamiento de la carne, fenómeno que se llama “maduración”; hay una recuperación parcial del poder de retención del agua y la capacidad final depende, en gran parte del proceso ocurrido en la rigidez (Primo, 1998).

En las carnes DFD (Carne Oscura, Firme y Seca), la glucólisis (formación de ácido) se desarrolla más lentamente o de manera incompleta. Este tipo de carne no alcanza en

ningún momento el pH normal, sino que permanece en niveles elevados de pH final por sobre 6.2, generalmente superiores e incluso hasta 7.0 (Jara, 2007). A este pH las proteínas tienen capacidad de retención de agua a causa del pH lejano a sus puntos isoeléctricos, pero hace que esta sea más susceptible al ataque microbiano (Ramos, 2014).

En las carnes PSE (Carne Pálida, Blanda y Exudativa): Los músculos en las carnes PSE se caracterizan por ser blandos, de color entre rosado claro y gris amarillento (Jara, 2007). Hay mucha actividad de proteasas, a pH 5, lo que produce blandura y mucha exudación (Primo, 1998). En la Tabla 4 se presenta la disminución del pH en la carne luego del faenado como indicador de calidad.

Tabla 4. Disminución del pH en la carne luego de la faena (post-mortem) como indicador de la calidad.

Calidad de carne	Evolución de la glucolisis	Valor de pH inicial	pH al final de la glucolisis	Momento de la medición post-mortem.
Normal	Lenta	7.2	aprox. 5.5	24 h
PSE	Rápida	7.2	<5.8	45 min
DFD	Lenta, incompleta	7.2	>6.2	24 h

Fuente: Varnam & Sutherland (1998).

2.3.2 Carne de cuy

La carne de cuy es magra es decir con un porcentaje de grasa menor al 10%, con un alto contenido de proteínas (20,3%), baja en contenidos de colesterol (65 mg/100 g) y sodio, por lo que es ideal para incluirla en una alimentación variada y equilibrada. Es una carne apta para todos los grupos poblacionales (niños, adolescentes, mujeres, deportistas, personas adultas y de la tercera edad) y en diversas situaciones fisiológicas, por ejemplo

el embarazo o la etapa de lactancia (Villavicencio, 2009). En el Tabla 5 se muestra Composición Química Nutricional de la carne de cuy fresca (100g).

Tabla 5. Composición química nutricional de la carne de cuy fresca (100g).

Composición	Unidad	Cantidad	
		*	**
Agua	g	78.1	77.1
Proteína	g	19.0	20.3
Grasa	g	1.6	7.8
Calcio	mg	2.9	2.7
Fosforo	mg	2.58	1.84
Hierro	mg	1.9	3.2
Tiamina	mg	0.06	0.08
Riboflavina	mg	0.14	0.15
Niacina	mg	6.5	5.43

Fuente: * INIA (2010); ** Hilvay (2015).

2.3.3 Valor nutritivo de carne de cuy

La carne del cuy es rica en proteínas, contiene también minerales y vitaminas. El contenido de grasas aumenta con el engorde. La carne de cuy puede contribuir a cubrir los requerimientos de proteína animal de la familia. Su aporte de hierro es importante, particularmente en la alimentación de niños y madres (Tuapanta, 2011). La comparación de la carne de cuy con otros productos cárnicos se puede apreciar en la Tabla 6.

2.3.4 Microbiología de la carne

La carne es un alimento altamente perecible ya que posee ciertas propiedades de importancia microbiológica que la hacen un excelente medio para el desarrollo de microorganismos. El desarrollo de los microorganismos ocurre primeramente a expensas de los constituyentes solubles como carbohidratos, ácidos lácticos y aminoácidos. La

actividad de agua de la carne fresca tiene un valor aproximado de 0.99, valor apropiado para la mayoría de los microorganismos, principalmente bacterias (Jara, 2007).

Tabla 6. Composición comparativa de productos cárnicos.

Especie	Proteína %	Grasa %	Calorías por kilo
Cuy	20.3	7.8	960
Conejo	20.4	8.0	1590
Cabra	18.7	9.4	1650
Ave	18.2	10.2	1700
Vacuno	18.7	18.2	2440
Porcino	12.4	35.8	3760
Ovino	18.2	19.4	2530

Fuente: Sarria (2005).

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en los cambios metabólicos que ocurren antes, durante y después del rigor mortis (Jara, 2007). La microflora bacteriana habitual de la carne fresca es muy heterogénea; está formada principalmente por: *Pseudomonas*, géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Brochotrix thermosphacta* y *Lactobacillus*, dependiendo de su número y especie pueden causar numerosas alteraciones y en algunos casos intoxicaciones. Dentro de las bacterias patógenas se pueden encontrar *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli enteropatógeno*, *Clostridium perfringens* y ocasionalmente *Clostridium botulinium* (Mateauda, 2013).

La contaminación microbiana proviene de varias fuentes, por ejemplo la contaminación inicial de la carne ocurre durante el desangrado, dado el uso de equipamiento no estéril en donde se introduce microorganismos en el sistema vascular. Fuentes de contaminación pueden incluir el agua, instalaciones, equipamiento y personal de manipulación (Barancelli, Hernández, & Contreras, 2011). Factores extrínsecos tales

como temperatura, humedad relativa, presencia o ausencia de oxígeno y estado físico de la carne, influye en la actividad microbiana. También sus propiedades intrínsecas, tales como contenido de humedad, pH, valor nutritivo y presencia o ausencia de barreras o sustancias inhibidoras. Sin embargo los factores que ejercen la máxima influencia en el crecimiento de microorganismos de la carne y productos cárnicos son la temperatura de almacenamiento, humedad y disponibilidad de oxígeno (Mateauda, 2013); en la Figura 2 se detalla el resumen de los factores que afectan la calidad de la carne.

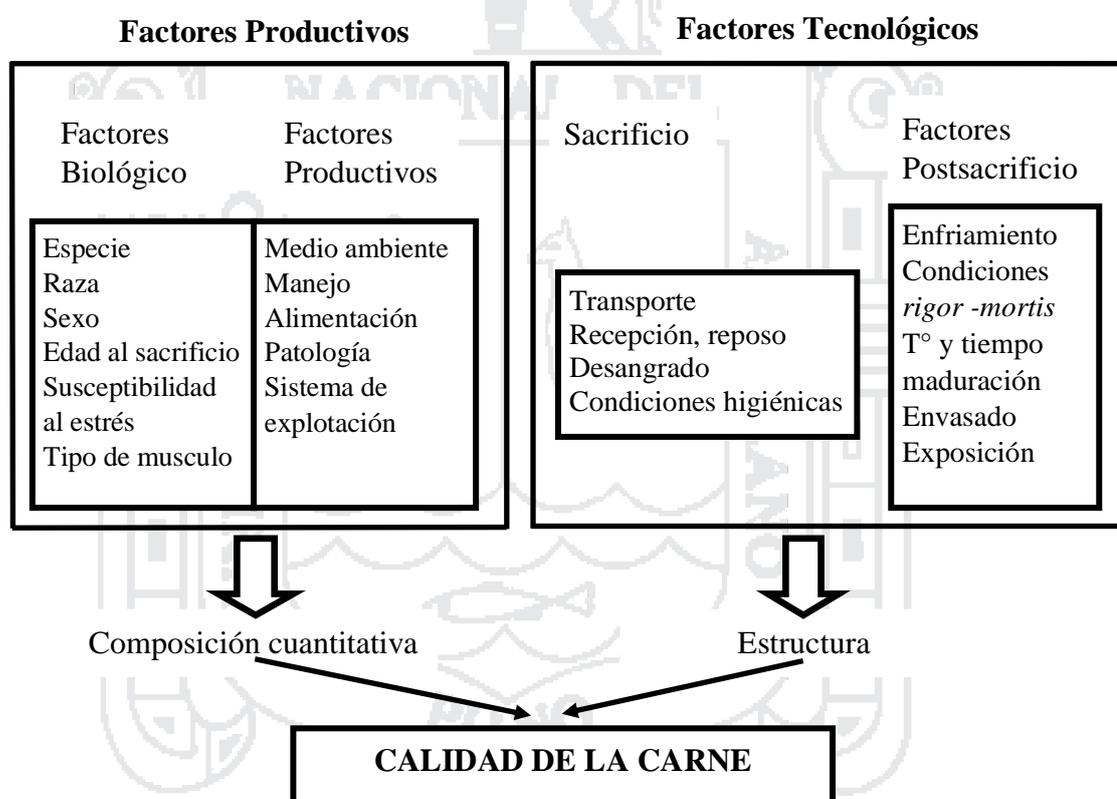


Fig. 2. Factores que influyen en la calidad de la carne (Jara, 2007; Mateauda, 2013).

En algunos animales tales como el cerdo, conejos y cuyes, la situación es bastante diferente que en otros animales ya que normalmente la piel no se quita, sino se escalda antes de eliminar los pelos. El escaldado puede dar lugar a una reducción de los recuentos microbianos, sin embargo el tanque de escaldado puede ser una fuente de contaminación

cruzada tanto con la flora intestinal como microorganismos de la piel (Varnam & Sutherland, 1998).

a. *Escherichia coli* O157:H7

La *Escherichia coli* es una bacteria en forma de bastón, con aproximadamente de 0,5 μm de diámetro de base, por 2 μm de longitud, es una bacteria Gram negativa comúnmente presente en el intestino de los animales, inclusive de los hombres, y ejerce un efecto benéfico sobre el organismo, suprimiendo la multiplicación de bacterias perjudiciales y sintetizando una considerable cantidad de vitaminas. Sin embargo entre las diversas cepas de *Escherichia coli*, existe un grupo capaz de provocar enfermedades en seres humanos, que son colectivamente llamadas *E. coli* patógenas (Franca, 2013).

b. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes pertenece al género listeria, el cual se caracteriza por ser bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, cortos no esporulados ni ramificados. Es móvil a 25°C pero inmóvil a 37°C por inactivación de flagelos. Sus colonias son pequeñas traslucidas y grises y la mayor parte de las cepas produce una zona estrecha de β hemólisis alrededor de las colonias (Perez & Sigaran, 2012). Es un microorganismo de distribución universal, relativamente resistente a la refrigeración, la sequedad y el calor extremo (Sánchez & Palencia, 2010).

Listeria monocytogenes está frecuentemente presente en alimentos crudos, tanto de origen vegetal como animal, y puede convertirse endémica en los entornos de elaboración de alimentos. Está también presente en alimentos cocinados, debido a la contaminación posterior a la elaboración o un tratamiento térmico insuficiente. *Listeria monocytogenes* se ha aislado de alimentos como leche líquida cruda y

pasteurizada, quesos (particularmente quesos de pasta blanda madurados), helados, hortalizas crudas, embutidos fermentados de carne cruda o cocida, carne de ave cruda o cocida, carnes crudas, y productos del mar crudos y ahumados (Schöbitz, Ciampi, & Nahuelquin, 2009).

c. *Salmonella spp*

Salmonella es un género de bacterias Gram negativos, anaerobias facultativas que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Aunque el principal reservorio es el tracto gastrointestinal de los mamíferos y aves, se ha aislado prácticamente en todo tipo de animales. Sobreviven largos periodos de tiempo en el ambiente, soportando bien la congelación y en gran medida la desecación. En determinadas condiciones, es capaz de multiplicarse en un ambiente exterior y en agua (Coma, 2001). En la Tabla 7 se muestra el rango de las condiciones del crecimiento de *Salmonella spp*.

Tabla 7. Rango de condiciones que permiten crecimiento de *Salmonella spp*.

Parámetro	Límite inferior	Óptimo	Límite superior
Temperatura	5°C	35 - 37 °C	45 °C
Actividad de agua	0,92	>0,96	
pH	4,0	6,5 – 7,5	9,0

Fuente: Coma (2001).

Los animales son los reservorios naturales de *Salmonella spp*. y carne de cerdo, aves y otros tipos de carne, huevos y productos lácteos son las fuentes más comúnmente implicados en brotes de salmonelosis (Allende *et al.*, 2013).

2.3.5 Conservación de la carne envasado al vacío

El envasado al vacío consiste en la eliminación total del aire del interior del envase sin que sea reemplazada por otro gas, existiendo una diferencia de presión entre el exterior y el interior del envase (Mateauda, 2013).

El envasado al vacío es un microsistema anaeróbico que retarda el crecimiento de bacterias aeróbicas tales como *Pseudomonas* y el nivel de los microorganismos anaerobios estricto y facultativo. El oxígeno restante se consume tanto por las actividades metabólicas de la carne como por las bacterias presentes en la superficie (Mateauda, 2013).

a. Alteración de la carne mediante envasado al vacío

En el caso particular del envasado al vacío; si en este no se consigue evacuar prácticamente todo el oxígeno o existen problemas de hermeticidad en el envase, las *Pseudomonas* se proliferan y alteran la carne de igual manera que en condiciones aeróbicas (Mateauda, 2013).

El deterioro de la carne envasada al vacío ocurre principalmente por *B. thermosphacta*, *A. putrefaciens* y *E. liquefaciens* se desarrolla en ausencia de oxígeno solo a elevadas temperaturas y sobre todo cuando se trata de carne DFD (Jara, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La ejecución del presente trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, en laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y en la culminación en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Laboratorio de Pos-cosecha en la Escuela Profesional Ingeniería Agroindustrial Facultad de Ciencias Agrarias.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

- Cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*; obtenidas del Laboratorio de higiene de alimentos - Instituto Nacional de Investigación en Alimentos – Japón.
- Aceite esencial de Orégano (*Origanum vulgare*), obtenido de la Empresa Essential Oils Perú – Trujillo.
- Carne de cuy, muestra proveniente del mercado Unión y Dignidad de la ciudad de Puno.

3.3 EQUIPOS Y MATERIALES

3.3.1 Equipos y materiales

- Autoclave modelo LS-BSOL-II, volumen 50L.
- Refrigeradora marca ICECROWN modelo 456C.009 (capacidad 200kg).
- Refrigeradora LEHEL COL-EIPH-ME-042.
- Balanza analítica marca AND FR-300 Japón, capacidad de 0,0001 a 310g.
- Cuenta colonias marca LIGHTBOX, modelo Petite.

- Vortex – GENIE MODEL K-550-G.
- Selladora, SEALER PFS-300, *Safari* import.
- Estufa marca LMN tipo LP5 – 402.
- Estufa MEMMERT Universal, 30-120°C, modelo TV - 40.
- Termómetro marca HANNA de -40 a 150°C.
- Espectrofotómetro UV.
- pH metro digital modelo 3510, marca JENWAY.
- Licuadora de vidrio marca ÓSTER.
- Cámara fotográfica SAMSUNG.
- Espátula ACERO INOX.
- Mechero de bunsen.
- Piceta (PVC).
- Micropipetas 100-1000µl, BOECO.
- Micropipetas 05-10µl, BOECO.
- Micro pipetas 10-100µl, BOECO.
- Microscopio ZEISS PFS-300 Safari, H.W.Kessel S.A.
- Gradillas.

3.3.2 Materiales de vidrio

- Erlenmeyer (250, 500 y 1000 ml).
- Probetas (10, 50 y 100 ml).
- Pipetas (1, 5 y 10 ml).
- Tubos de ensayo PIREX.
- Placas Petri PIREX.
- Vasos precipitados (100 ml).

3.3.3 Reactivos e insumos

- Alcohol de 70°.
- Agua destilada.
- Cloruro de Bario al 1%.
- Etanol absoluto, (Merck peruana SAC).
- Agua de peptona, (Merck peruana SAC).

3.3.4 Medios de cultivo

- Caldo Verde Brillante Bilis (CVBB), (Merck peruana SAC).
- Caldo Muller Hinton (Merck peruana SAC).
- Agar Mc Conkey, (Merck peruana SAC).
- Agar SS, Merck (Merck peruana SAC).
- Agar PALCAM, (Merck peruana SAC).
- Agar sangre.
- Agar Eosin Methylene-blue Lactose Agar acc. (Agar EMB), (Merck peruana).

3.3.5 Otros materiales

- Papel aluminio.
- Papel kraft.
- Tips 0.5µl, 10 µl.
- Bolsas de polietileno.
- Lapiceros.
- Marcadores.
- Tabla de picar, cuchillo.
- Caja isotérmica (tecnopor).
- Algodón.

3.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

La metodología utilizada durante el proceso de investigación del proyecto fue de tipo experimental cuyos procesos de obtención, producción, control y análisis son los siguientes (Fig. 3).

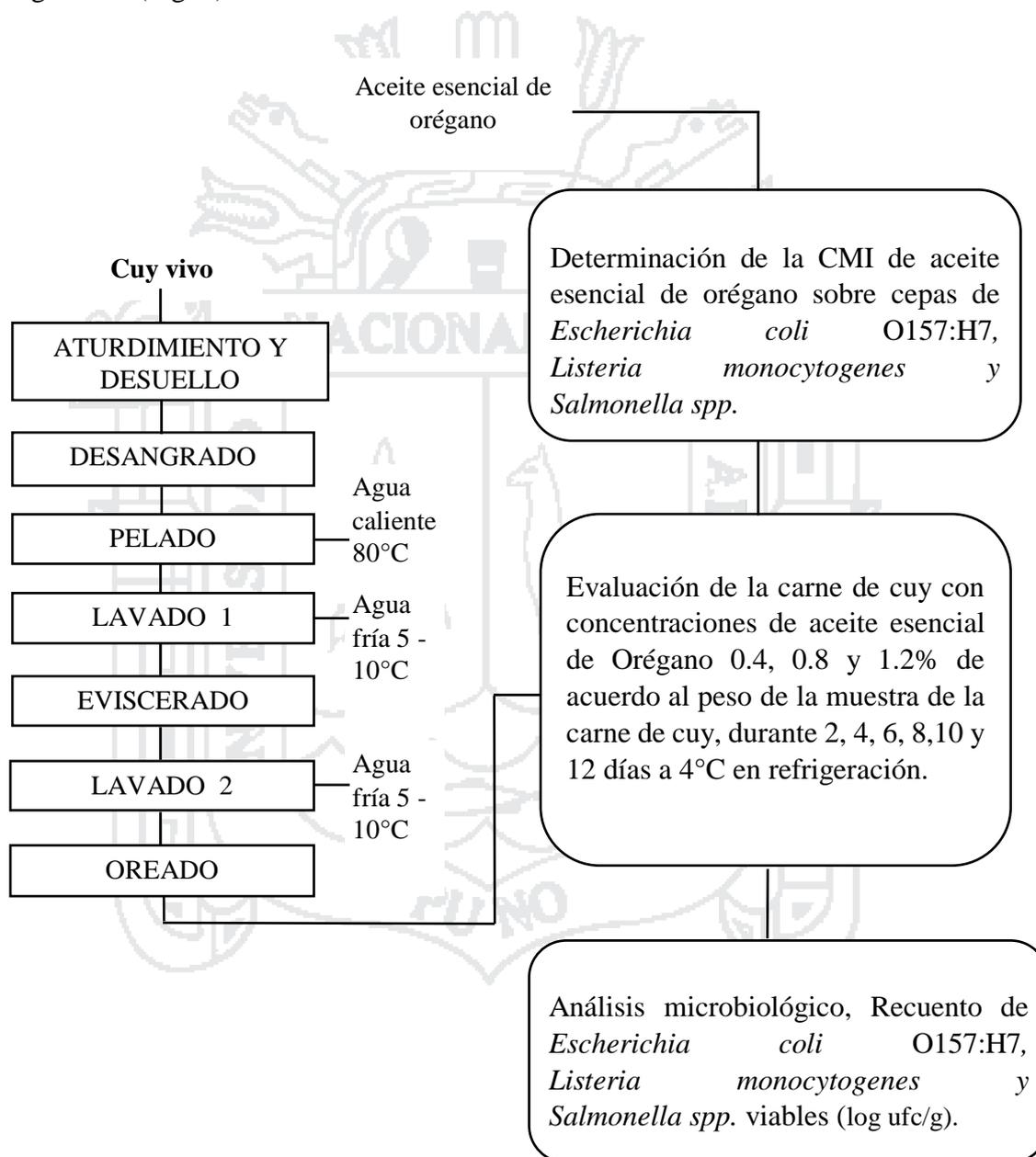


Fig. 3. Descripción del flujo experimental

3.4.1 Preparación y conservación de cepas bacterianas

- *Escherichia coli* O157:H7 se adquirió del Laboratorio de Higiene de Alimentos - Instituto Nacional de Investigación en Alimentos – Japón. La cepa se reactivó en agar Mc Conkey y se incubó durante 24 horas a 37°C para su crecimiento luego se realizó tinción Gram; para la conservación de las cepas se repicó del agar Mc Conkey en tubos inclinados con agar Sangre que se almacenaron a 4°C, durante el estudio se mantuvieron su viabilidad y pureza.
- *Listeria monocytogenes* se adquirió del Laboratorio de Higiene de Alimentos - Instituto Nacional de Investigación en Alimentos – Japón. La cepa se reactivó en agar Sangre y se incubó durante 24 horas a 37°C para su crecimiento luego se realizó tinción Gram; para la conservación de las cepas se repicó del agar sangre en tubos inclinados con agar Sangre que se almacenaron a 4°C, durante el estudio se mantuvieron su viabilidad y pureza.
- *Salmonella spp.* se adquirió del Laboratorio de Higiene de Alimentos - Instituto Nacional de Investigación en Alimentos – Japón. La cepa se reactivó en agar SS y se incubó durante 24 horas a 37°C para su crecimiento luego se realizó tinción Gram; para la conservación de las cepas se repicó del agar SS en tubos inclinados con agar Sangre que se almacenaron a 4°C, durante el estudio se mantuvieron su viabilidad y pureza.

3.4.2 Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*) sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*

El presente trabajo del aceite esencial de orégano sobre cepas *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, se evaluó mediante

el método de macrodilución en caldo para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria donde se determinó como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un microorganismo descrito por el “Clinical Laboratory Standard Institute” (CLSI antes NCCLS) según la metodología de Boskovic *et al.*, (2015).

a. Solución estándar o madre

Según la metodología de Lagos, (2012).

- El aceite esencial de orégano es 100% puro con una densidad de 0.9259 g/ml lo que indica que en 1000 μ l existían 926 μ g de aceite esencial de orégano.
- Se determinó 5000 μ l de solución madre donde se utilizó 2560 μ l de aceite más 2440 μ l de diluyente, para obtener una concentración de 256 μ g/ml.

b. Preparación del inóculo

- Se repicó una colonia de *Escherichia coli* O157:H7 en agar Mc conkey, *Listeria monocytogenes* en agar PALCAM y *Salmonella spp* en agar Mc conkey luego fueron incubados a 37°C por 24 horas. En un tubo de ensayo de volumen de 10 ml con agua esterilizada y con un asa de siembra se agregó las cepas correspondientes (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*), se llevó al equipo de vortex para su respectivo homogenizado, cuyo grado de turbidez comparado con la escala de 0.5 de Mac Farland (Anexo1).

c. Procedimiento

- Se adiciono 0.5 ml del inóculo de suspensión de los microorganismos (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*) en los tubos de ensayo contenido con las siguientes concentraciones de aceite esencial de orégano: 128 μ g/ml , 64 μ g/ml, 32 μ g/ml, 16 μ g/ml, 8 μ g/ml, 4 μ g/ml, 2 μ g/ml,

1 µg/ml, 0.5 µg/ml y 0.25 µg/ml en tubos correspondientes; caldo Mueller Hinton, en tubos control de inóculo y control de esterilidad. Inmediatamente después de haber preparado los tubos para determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) se incubaron a 37°C por 24 horas.

d. Lectura e interpretación

- Al cabo de 24 horas se observó la turbidez de los tubos que indicó el desarrollo bacteriano (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*) en los tubos que se observó con una concentración correspondiente del aceite esencial de orégano que presente ausencia de turbidez (igualando al control negativo), que se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

3.4.3 Preparación de la carne de cuy fresca con adición del aceite esencial de orégano

Usando la metodología de Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, (2014) . Para la preparación de las muestras se inóculo 4.00 log ufc/g (turbidez estándar de 0.5) de *Echerichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* Se adicionó aceite esencial de orégano en concentraciones de 0.4, 0.8 y 1.2 % (% de volumen/peso) en la carne de cuy se masajeo por 2 minutos a cada muestra. Finalmente la carne de cuy se envaso al vacío y se almacenó a temperatura de refrigeración (4°C ± 1°C) durante 12 días.

3.4.4 Evaluación microbiológica de la carne de cuy con aceite esencial de orégano.

a. Enumeración de *Echerichia coli* O157:H7, en la carne de cuy con aceite esencial

La metodología se realizó de acuerdo a Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini (2014).

a.1. Preparación de diluciones

Para el análisis microbiano, se pesaron en un vaso previamente tarado 5 g de carne de cuy con 45 ml de agua destilada estéril homogenizándolo hasta conseguir 15.000 a 20.000 rpm en la licuadora y finalmente se obtuvo una dilución 10^{-1} . Luego se tomó 1 ml del homogenizado y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de diluyente, obteniéndose así la dilución 10^{-2} , prosiguiendo hasta obtener más diluciones.

a.2. Siembra

Se pipetearon alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , sobre placas con Agar Mc Conkey previamente temperadas. Seguidamente se mezclaron las alícuotas con el agar, mediante movimientos de vaivén y rotación para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

a.3. Conteo de colonias

Transcurridas las 24 horas de incubación se procedió al conteo de colonias en las placas fueron seleccionados para el conteo. El número de *Echerichia coli* O157:H7 viables por gramo de muestra es reportado los resultados en log ufc/g.

b. *Listeria monocytogenes* en la carne de cuy con aceite esencial

La metodología se realizó de acuerdo a Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini (2014).

b.1. Preparación de diluciones

Para el análisis microbiano, se pesó en un vaso previamente tarado 5 g de carne de cuy con 45 ml de agua destilada estéril homogenizándolo hasta conseguir 15.000 a 20.000 rpm (revoluciones por minuto) en la licuadora y finalmente se obtuvo una dilución 10^{-1} . Luego se tomó 1 ml del homogenizado y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de diluyente, obteniéndose así la dilución 10^{-2} , prosiguiendo hasta obtener más diluciones.

b.2. Siembra

Se pipetearon alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , sobre placas con Agar PALCAM previamente temperadas. Seguidamente se mezclaron las alícuotas en el agar, mediante movimientos de vaivén y rotación para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

b.3. Conteo de colonias

Transcurrida las 24 horas de incubación se procedió al conteo de colonias en las placas fueron seleccionados para el conteo. El número de *Listeria monocytogenes* viables por gramo de carne es reportado los resultados en log ufc/g.

c. *Salmonella spp.* en la carne de cuy con aceite esencial

La metodología se realizó de acuerdo Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini (2014).

c.1. Preparación de diluciones

Para el análisis microbiano, se pesaron en un vaso previamente tarado 5 g de carne de cuy con 45 ml de agua destilada estéril homogenizándolo hasta conseguir 15.000 a 20.000 rpm (revoluciones por minuto) en la licuadora y finalmente se obtuvo una dilución 10^{-1} . Luego se tomó 1ml del homogenizado y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de diluyente, obteniéndose así la dilución 10^{-2} , prosiguiendo hasta obtener más diluciones.

c.2. Siembra

Se pipetearon alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , sobre placas con Agar SS previamente temperadas. Seguidamente se mezcló las alícuotas en el agar, mediante movimientos de vaivén y rotación para su posterior incubación a 37°C durante 24 horas.

c.3. Conteo de colonias

Transcurrida las 24 horas de incubación se procedió al conteo de colonias en las placas fueron seleccionados para el conteo. El número de *Salmonella spp* viables por gramo de carne es reportado los resultados en log ufc/g.

3.4.5 Reacción cinética básica para determinar la pérdida de la calidad de los alimentos

Reacción de Orden Cero: Consideremos un atributo de calidad Q , que disminuya de forma lineal durante el periodo de almacenamiento. Una disminución lineal del atributo implica que su variación con respecto al tiempo es constante, y que por lo tanto, la pérdida de dicho atributo y tiempo se obtiene cuando la reacción es de orden cero.

$$-\frac{dQ}{dt} = k$$

Integrando la ecuación se obtiene:

$$Q = Q_0 - kt$$

Dónde: Q_0 representa el valor inicial del atributo de calidad y Q es el valor que toma dicho atributo después de transcurrido el tiempo t .

Si el final de la vida útil t_u , se alcanza cuando el atributo de calidad toma un cierto valor, llamado Q_f , tendremos:

$$Q = Q_0 - kt_u$$

En consecuencia, la vida útil t_u , será:

$$t_u = \frac{Q_0 - Q_f}{k}$$

3.4.6 Diseño estadístico

a. Evaluación de la carne de cuy fresca en diferentes concentraciones con adición del aceite esencial de orégano

Para procesar los datos obtenidos durante la investigación se aplicó el análisis de varianza (ANVA), con un nivel de confianza del 95% y el test de Duncan ($p \leq 0.05$) para determinar las posibles diferencias entre las muestras de carne de cuy con la adición de aceite esencial de orégano, para lo cual se empleó el software SPSS V 21 en español. Para comparar el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano en la carne de cuy; con una carga microbiana de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* se aplicó el diseño estadístico Modelo Lineal General.

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + e$$

Donde:

Y = Representa la variable dependiente.

$X_1 X_2$ = Son las variables independientes.

$B_0 B_1 B_2$ = Son los parámetros desconocidos que será estimado.

e = Efecto del error experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*

En la Tabla 8, se presenta los resultados de la concentración del aceite esencial de orégano sobre cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* que se obtuvo por Concentración Mínima Inhibitoria.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano sobre cepas bacterianas.

Cepas bacterianas	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	3.5 \pm 0.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.5 \pm 1.0
<i>Salmonella spp</i>	2.5 \pm 1.0

n = 4

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

Con el desarrollo del trabajo se logró determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano para evidenciar los resultados obtenidos se muestran en Anexo 6. El aceite esencial de orégano mostró mayor actividad antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes* requiriendo una concentración mínima inhibitoria de 1.5 $\mu\text{g/ml}$, seguido de *Salmonella spp* con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de aceite esencial de orégano y una mayor CMI de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ para *Escherichia coli* O157:H7 en comparación de las tres cepas tuvo más efecto en la bacteria Gram positivo (*Listeria monocytogenes*) con menor concentración de aceite esencial de orégano y en las bacterias Gram negativos (*Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7) se logró mayor concentración de aceite esencial. Estos resultados son similares a los reportado por Boskovic *et al.*, (2015) quienes

señalan que el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano y tomillo sobre cepas aislada de los alimentos (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *S. aureus*) donde muestran que el aceite esencial de orégano tuvo mejor concentración mínima inhibitoria en *S. aureus*. Por otro lado Burt (2007) menciona al aceite esencial de orégano frente a los patógenos transmitidos por los alimentos; *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *S. aureus* con una CMI de 0.5 a 1.2 $\mu\text{g/ml}$, 1.2 $\mu\text{g/ml}$ y 0.5 a 1.2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Así mismo Burt (2007) menciona al aceite esencial de orégano contiene fuertes propiedades antimicrobianas que atribuyen por su alto contenido fenólico; carvacrol, timol, p-cinemo y α -terpineno que tienen una actividad antimicrobiana ligeramente más activa sobre bacterias Gram positivas que en bacterias Gram negativas. Esto es debido a que surge como resultado de las diferencias en su estructura de la pared celular (Gendy *et al.*, 2015; Ocares, 2012) donde las bacterias Gram negativas son más complejas; que la pared celular de las bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram negativas muestran ser menos susceptibles a la acción de los antibacterianos, se debe a que estos poseen dos capas que protegen la célula y proporcionan rigidez (una capa de peptidoglucano delgada y una membrana externa que contiene liposacaridos) por cual muestran ser menos susceptible al aceite esencial (Ocares, 2012).

Al intentar realizar una comparación de los resultados obtenidos resulta muy difícil debido a que existe muchos factores, donde influye el análisis comparativo, plantas utilizadas, métodos de extracción del aceite esencial, condiciones climáticas y geográficamente donde las plantas fueron cultivadas, entre otros (Raygoza, 2005). Estos elementos mencionados hacen que los resultados de la CMI obtenida sean muy variable.

4.2 Evaluación de la concentración del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) durante el tiempo de almacenamiento en el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* en la carne de cuy (*Cavia porcellus*).

Para la determinación del efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano durante el tiempo de almacenamiento se realizó una evaluación de las propiedades químicas y microbiológicas durante un periodo de 12 días en condiciones de refrigeración (4°C) cuyos resultados y discusiones se detallan a continuación.

4.2.1 Evaluación del pH

Los resultados obtenidos para evidenciar los resultados de los valores de pH se muestran en el Anexo 7.

a) *Listeria monocytogenes*

En la Tabla 9, se presenta los valores del pH de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo, en donde se observa el pH de la carne de cuy con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano 0% (control), 0.4%, 0.8% y 1.2%, donde se encuentra entre los rangos de pH 6.82 a 6.81, 6.80 a 6.71, 6.79 a 6.70 y 6.83 a 6.68 respectivamente. En el cual no se muestran dentro del rango para la carne de cuy 5.5 a 6.4 (Nakandakari *et al.*, 2014); probablemente sea debido que el animal sufrió un estrés durante un periodo largo o que hayan sido obligados a realizar un ejercicio físico prolongado donde la acidificación *postmortem* será limitada ya que no habrá glucógeno muscular disponible para transformarse en ácido láctico, por lo cual el pH no descenderá hasta los valores normales (Garrido, Bañón, & Álvarez, 2005). Según Jara (2007), nos indica que es una carne DFD donde menciona que este tipo de

carne no alcanza en ningún momento el pH normal, si no que permanece en niveles elevados de pH final por sobre los 6.2 superiores e incluso hasta los 7.0. A este pH las proteínas tienen una capacidad de retención de agua, a causa del pH lejano a sus puntos isoeléctricos y hace que esta sea más susceptible al ataque microbiano (Ramos, 2014).

Tabla 9. Valores de pH en la carne de cuy (*Listeria monocytogenes*) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo de almacenamiento.

Día	Concentraciones			
	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
0	6.82 ± 0.04 ^a	6.80 ± 0.02 ^a	6.79 ± 0.05 ^a	6.83 ± 0.06 ^a
2	6.82 ± 0.03 ^a	6.82 ± 0.03 ^a	6.79 ± 0.09 ^a	6.84 ± 0.06 ^a
4	6.80 ± 0.08 ^a	6.82 ± 0.04 ^a	6.79 ± 0.02 ^a	6.81 ± 0.07 ^a
6	6.84 ± 0.04 ^a	6.77 ± 0.07 ^a	6.75 ± 0.06 ^a	6.78 ± 0.04 ^a
8	6.84 ± 0.07 ^b	6.77 ± 0.08 ^{ab}	6.71 ± 0.03 ^a	6.78 ± 0.05 ^{ab}
10	6.82 ± 0.08 ^b	6.72 ± 0.04 ^a	6.70 ± 0.02 ^a	6.73 ± 0.04 ^a
12	6.81 ± 0.04 ^b	6.71 ± 0.04 ^a	6.70 ± 0.02 ^a	6.68 ± 0.03 ^a

n :3

AE : Aceite esencial

En la Tabla 19; (Anexo 9), se presenta el análisis de varianza del pH de la carne de cuy con *Listeria monocytogenes*, donde se observa que los días 0, 2, 4, 6 y 8 días no existe diferencia significativa ($p < 0.05$), es decir que no existe diferencia entre la muestra control con las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0.4 %, 0.8 % y 1.2 % AE) y los días 10 y 12 días si existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la carne de cuy de la muestra control con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, por lo que fue necesario realizar la prueba de Duncan para los mencionados casos.

En la Tabla 20 (Anexo 9), se observa la prueba de Duncan para el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano y la muestra control con respecto a los resultados de pH obtenidos durante el periodo de almacenamiento, en donde hasta los 8 días son similares estadísticamente y en 10 y 12 días en donde se observa que las muestras con diferentes concentraciones de aceite esencial son similares y diferentes a la muestra control, lo que hace dar cuenta que el aceite esencial influyó en la variabilidad del pH.

b) *Salmonella spp*

En la Tabla 10, se presenta los valores de pH de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo, en donde se observa el pH de la carne de cuy con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano 0% (control), 0.4%, 0.8% y 1.2%, donde se encuentra entre los rangos de 6.77 a 6.91, 6.77 a 6.77, 6.78 a 6.78 y 6.78 a 6.77 respectivamente, en el cual no se muestran dentro del rango para la carne de cuy 5.5 a 6.4 (Nakandakari *et al.*, 2014); probablemente sea debido que el animal sufrió un estrés durante un periodo largo o que hayan sido obligados a realizar un ejercicio físico prolongado donde la acidificación *postmortem* será limitada ya que no habrá glucógeno muscular disponible para transformarse en ácido láctico, por lo cual el pH no descenderá hasta los valores normales (Garrido, Bañón, & Álvarez, 2005). Según Jara (2007), nos indica que es una carne DFD donde menciona que este tipo de carne no alcanza en ningún momento el pH normal, que permanece en niveles elevados de pH final por sobre los 6.2 superiores e incluso hasta los 7.0. A este pH las proteínas tienen una capacidad de retención de agua, a causa del pH lejano a sus puntos isoeléctricos y hace que esta sea más susceptible al ataque microbiano (Ramos, 2014).

En la Tabla 21; (Anexo 10), se presenta el análisis de varianza del pH de la carne de cuy con *Salmonella spp*, donde se observa que los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días no existe

diferencia significativa ($p < 0.05$), es decir que no existe diferencia entre la muestra control con las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0.4 %, 0.8 % y 1.2 % AE).

Tabla 10. Valores de pH en la carne de cuy (*Salmonella spp*) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo de almacenamiento.

Día	Concentraciones			
	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
0	6.77 ± 0.09 ^a	6.77 ± 0.12 ^a	6.78 ± 0.06 ^a	6.78 ± 0.07 ^a
2	6.83 ± 0.07 ^a	6.76 ± 0.13 ^a	6.77 ± 0.11 ^a	6.78 ± 0.08 ^a
4	6.84 ± 0.08 ^a	6.77 ± 0.10 ^a	6.76 ± 0.12 ^a	6.79 ± 0.11 ^a
6	6.87 ± 0.09 ^a	6.78 ± 0.06 ^a	6.77 ± 0.09 ^a	6.78 ± 0.11 ^a
8	6.84 ± 0.06 ^a	6.77 ± 0.11 ^a	6.78 ± 0.08 ^a	6.77 ± 0.12 ^a
10	6.85 ± 0.09 ^a	6.78 ± 0.07 ^a	6.78 ± 0.09 ^a	6.77 ± 0.05 ^a
12	6.91 ± 0.13 ^a	6.77 ± 0.14 ^a	6.78 ± 0.11 ^a	6.77 ± 0.09 ^a

n=3

AE: Aceite esencial

En la Tabla 22 (Anexo 10), se observa la prueba de Duncan para el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano y la muestra control con respecto a los resultados de pH obtenidos durante el periodo de almacenamiento, en donde hasta los 12 días son similares estadísticamente, lo que hace dar cuenta que el aceite esencial no influyó en la variabilidad del pH.

c) *Escherichia coli* O157:H7

En la Tabla 11, se presenta los valores de pH de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en relación al tiempo, en donde se observa el pH de la carne de cuy con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano 0%

(control), 0.4%, 0.8% y 1.2%, donde se encuentra entre los rangos de pH 6.78 a 6.80, 6.80 a 6.80, 6.79 a 6.80 y 6.78 a 6.79 respectivamente, en el cual no se muestran dentro del rango para la carne de cuy 5.5 a 6.4 (Nakandakari *et al.*, 2014); probablemente sea debido que el animal sufrió un estrés durante un periodo largo o que hayan sido obligados a realizar un ejercicio físico prolongado donde la acidificación *postmortem* será limitada ya que no habrá glucógeno muscular disponible para transformarse en ácido láctico, por lo cual el pH no descenderá hasta los valores normales (Garrido, Bañón, & Álvarez, 2005). Según Jara (2007), nos indica que es una carne DFD donde menciona que este tipo de carne no alcanza en ningún momento el pH normal, si no que permanece en niveles elevados de pH final por sobre los 6.2 superiores e incluso hasta los 7.0. A este pH las proteínas tienen una capacidad de retención de agua, a causa del pH lejano a sus puntos isoeléctricos y hace que esta sea más susceptible al ataque microbiano (Ramos, 2014).

Tabla 11. Valores de pH en la carne de cuy (*Escherichia coli* O157:H7) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano a través del tiempo de almacenamiento.

Día	Concentraciones			
	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
0	6.78 ± 0.08 ^a	6.80 ± 0.07 ^a	6.79 ± 0.03 ^a	6.78 ± 0.11 ^a
2	6.80 ± 0.09 ^a	6.80 ± 0.08 ^a	6.82 ± 0.11 ^a	6.78 ± 0.10 ^a
4	6.81 ± 0.10 ^a	6.80 ± 0.13 ^a	6.75 ± 0.11 ^a	6.75 ± 0.11 ^a
6	6.82 ± 0.07 ^a	6.81 ± 0.05 ^a	6.79 ± 0.10 ^a	6.75 ± 0.11 ^a
8	6.80 ± 0.08 ^a	6.78 ± 0.09 ^a	6.79 ± 0.10 ^a	6.78 ± 0.11 ^a
10	6.82 ± 0.13 ^a	6.81 ± 0.07 ^a	6.81 ± 0.10 ^a	6.80 ± 0.10 ^a
12	6.80 ± 0.12 ^a	6.80 ± 0.08 ^a	6.80 ± 0.11 ^a	6.79 ± 0.11 ^a

n: 3

AE : Aceite esencial

En la Tabla 23; (Anexo 11), se presenta el análisis de varianza del pH de la carne de cuy con *Escherichia coli* O157:H7, donde se observa que los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días no existe diferencia significativa ($p < 0.05$), es decir que no existe diferencia entre la muestra control con las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0.4 %, 0.8 % y 1.2 % AE),

En la Tabla 24; (Anexo 11), se observa la prueba de Duncan para el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano y la muestra control con respecto a los resultados de pH obtenidos durante el periodo de almacenamiento, en donde hasta los 12 días son similares estadísticamente, lo que hace dar cuenta que el aceite esencial no influyó en la variabilidad del pH.

4.2.2 Evaluación de los análisis de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 en las muestras de las carnes de cuy tratada con aceite esencial de orégano

a) Evaluación de *Listeria monocytogenes*

En la Tabla 12, se presenta los resultados del recuento total de *Listeria monocytogenes* viable analizado en la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0, 0.4, 0.8 y 1.2%), durante 12 días de almacenamiento a una temperatura de refrigeración a 4°C.

A si mismo se observa en todas las muestras de carne de cuy tienen una carga microbiana inicial de 4.00 ± 0.00 log ufc/g de *Listeria monocytogenes*. Las muestras del grupo control se observa a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento, aumenta la carga microbiana de *Listeria monocytogenes* hasta llegar al día 12 a 4.74 ± 0.02 log ufc/g, igualmente observamos las muestras de carne de cuy tratadas con concentraciones de aceite esencial de orégano en 0.4 %, 0.8 % y 1.2 % donde tienen una

reducción de la carga microbiana, a partir del día 2 hasta el día 12. Donde se observa que a los 12 días, de almacenamiento alcanzo hasta 3.23 ± 0.05 log ufc/g, 2.83 ± 0.13 log ufc/g y 1.00 ± 0.00 log ufc/g respectivamente. Las muestras tratadas con AE 1.2% muestran una población de *Listeria monocytogenes* más bajos que las muestras del grupo control, durante el periodo de almacenamiento. Sin embargo las muestras tratadas con AE 0.4% y AE 0.8% disminuyen en menor población de *Listeria monocytogenes* en comparación con las muestras del grupo control. La concentración AE 1.2% disminuye la carga microbiana de *Listeria monocytogenes*, que van por debajo del nivel aceptable (<2 log ufc/g) a partir del día 10 hasta el final del almacenamiento (Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, 2014; Gudbjornsdóttir *et al.*, 2004).

Tabla 12. Recuento microbiano de *Listeria monocytogenes* viable de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en log ufc/g.

Día	Concentraciones			
	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
0	4.00 ± 0.00^a	4.00 ± 0.00^a	4.00 ± 0.00^a	4.00 ± 0.00^a
2	4.15 ± 0.03^d	3.85 ± 0.08^c	3.61 ± 0.02^b	3.11 ± 0.08^a
4	4.25 ± 0.04^d	3.84 ± 0.01^c	3.59 ± 0.03^b	2.97 ± 0.03^a
6	4.47 ± 0.01^d	3.71 ± 0.01^c	3.43 ± 0.06^b	2.69 ± 0.09^a
8	4.61 ± 0.03^d	3.64 ± 0.05^c	3.31 ± 0.03^b	2.36 ± 0.10^a
10	4.73 ± 0.04^d	3.44 ± 0.05^c	3.14 ± 0.09^b	1.00 ± 0.00^a
12	4.74 ± 0.02^d	3.23 ± 0.05^c	2.83 ± 0.13^b	1.00 ± 0.00^a

n=3

AE : Aceite esencial

a, b, c, d : Prueba de comparación Duncan

Los resultados obtenidos son similares con Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, (2014), quien determino la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos

de plantas, para controlar la *Listeria monocytogenes* inoculado en carne picada de pescado; donde analizaron la carga microbiana en las muestras durante el almacenamiento a 4°C, la población inicial de *Listeria monocytogenes* del tratamiento control aumento durante el periodo de almacenamiento y las muestras que fueron tratadas con AE de tomillo en 0,8, y 1,2% muestran una población más bajas que la muestra control durante el periodo de almacenamiento. Por otro lado Hilvay (2015) realizó un estudio del efecto de los diferentes aceites esenciales (albaca, limón y orégano) en la conservación de la carne de cuy, obteniendo su resultado con mayor efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano en la disminución de la carga microbiana en una bacteria Gram positivo. De manera similar Pesavento *et al.* (2015) muestra en su estudio realizado en albóndigas de carne con tres aceites esenciales (orégano, romero y tomillo) determinando que su mejor tratamiento fue el de aceite esencial de orégano, donde disminuyó el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el tiempo de almacenamiento.

Esto demuestra que el aceite esencial de orégano presenta una actividad antimicrobiana contra la proliferación de *Listeria monocytogenes*. Además el aceite esencial de orégano es un potencial antimicrobiano que se atribuyen por su alto contenido fenólico (Burt, 2007), donde sus componentes principales son: carvacrol, timol, seguido de p-cinemo, γ -terpineno, linalool, terpinen-4-ol (Gendy *et al.*, 2015). Al respecto Burt (2007), señala que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es atribuida a la perturbación de la membrana citoplasmática y la interrupción de la fuerza motriz de los protones del flujo de electrones del transporte activo y a la coagulación de los contenidos celulares, generando degradación de la pared celular, membrana citoplasmática y membrana proteica de los microorganismos.

En la Tabla 25; (Anexo 12), se observa el análisis de varianza del recuento viable de *Listeria monocytogenes* presente en la carne de cuy adicionada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano; existe diferencia altamente significativa ($p < 0.05$), entre los valores de *Listeria monocytogenes* viable para los tratamientos y tiempo, es decir que existe diferencia entre el tratamiento con diferentes concentraciones aceite esencial y la muestra control, así como para el tiempo de evaluación, con un 95 % de nivel de significancia; por lo que fue necesaria la realización de la prueba de comparación de Duncan, tal como se muestra en la Tabla 26.

En la Tabla 26 (Anexo 12), se observa la prueba de Duncan para el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano y la muestra control con respecto a los resultados de *Listeria monocytogenes* viable, que existe diferencias entre la carne de cuy de la muestra control presenta un incremento promedio hasta 4.74 ± 0.02 log ufc/g del crecimiento de la bacteria, indica claramente a mayor concentraciones de aceite esencial de orégano disminuyen el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes*, mostrando con una concentración de 1,2% AE de orégano siendo la mejor en la disminución del crecimiento microbiano, indica claramente, una función como medio protector contra la proliferación de *Listeria monocytogenes*.

b) Evaluación de *Salmonella spp*

En la Tabla 13, se presenta los resultados del recuento total de *Salmonella spp*. viable analizado en la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0, 0.4, 0.8 y 1.2%), durante 12 días de almacenamiento a una temperatura de refrigeración a 4°C.

Tabla 13. Recuento microbiano de *Salmonella spp* de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en log ufc/g.

Día	Concentraciones			
	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
0	4.00 ± 0.00 ^a			
2	4.15 ± 0.03 ^d	3.81 ± 0.06 ^c	2.65 ± 0.05 ^b	2.39 ± 0.09 ^a
4	4.16 ± 0.03 ^d	3.78 ± 0.01 ^c	2.47 ± 0.07 ^b	2.22 ± 0.07 ^a
6	4.30 ± 0.01 ^d	3.70 ± 0.01 ^c	2.22 ± 0.07 ^b	1.70 ± 0.00 ^a
8	4.32 ± 0.09 ^c	3.62 ± 0.03 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
10	4.37 ± 0.02 ^c	3.39 ± 0.04 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
12	4.38 ± 0.01 ^c	3.18 ± 0.04 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a

n=3

AE : Aceite esencial

a, b, c, d : Prueba de comparación Duncan

Se observa en todas las muestras de carne de cuy tienen una carga microbiana inicial de 4.00 ± 0.00 log ufc/g de *Salmonella spp*. Las muestras del grupo control se observa a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento, aumenta la carga microbiana de *Salmonella spp* hasta llegar al día 12 a 4.38 ± 0.01 log ufc/g, igualmente observamos las muestras de carne de cuy tratadas con concentraciones de aceite esencial de orégano en 0.4%, 0.8% y 1.2% donde tienen una reducción de la carga microbiana, a partir del día 2 hasta el día 12. Donde se observa que a los 12 días, de almacenamiento alcanzo hasta 3.18 ± 0.04 log ufc/g, 1.00 ± 0.00 log ufc/g y 1.00 ± 0.00 log ufc/g respectivamente. Las muestras tratadas con AE 0.8% y AE 1.2% muestran una población de *Salmonella spp* más bajos que las muestras del grupo control, durante el periodo de almacenamiento. Sin embargo las muestras tratadas con AE 0.4% disminuyen en menor población de *Salmonella spp* en comparación con las muestras del grupo control. Por tanto en las muestras tratadas con 0.8 y 1.2% con la adición de aceite esencial de orégano, presentan una disminución de la carga microbiana (*Salmonella spp*) con respecto a la

muestra control y 0.4% AE de órgano, que se encuentra debajo del nivel aceptable ($<2 \log \text{ ufc/g}$) a partir del día 8 hasta el final del almacenamiento (Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, 2014; Gudbjornsdóttir *et al.*, 2004).

Estos resultados son similares a los reportado por Govaris *et al.*, (2010) realizó su investigación, del efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (0.6, 0.9%), nisina (500, 1.000 UI/g) y su combinación frente *Salmonella spp*, en carne de ovino picada durante el almacenamiento (4°C y 10°C) de 12 días; en sus resultado obtienen su mejor tratamiento de 0.9% de aceite esencial de orégano combinado con nisina en 500 y 1000 UI/g para controlar la carga microbiana de *Salmonella spp*. Por otro lado Campoverde (2011) realizo un estudio en evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y tomillo como potenciales bioconservadores en la carne de pollo, donde buscó reducir la carga microbiana de *Salmonella spp* durante el almacenamiento, donde menciona que su mejor tratamiento fue obtenido con el aceite esencial de tomillo y segundo mejor tratamiento corresponde al aceite esencial de orégano, aun así el autor indica que el aceite esencial de orégano también puede ser utilizado como agente antimicrobiano en caso no se disponga del aceite de tomillo, por mostrar efectividad en la disminución de la carga microbiana. De manera similar Frangos *et al.* (2010) menciona en su investigación el efecto del aceite de orégano en filetes de trucha en refrigeración, donde se trató con bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos resultados muestran un efecto en la disminución de *Enterobacteriaceae* durante el tiempo de almacenamiento.

Esto demuestra que el aceite esencial de orégano presentó actividad antimicrobiana contra la proliferación de *Salmonella spp*. Además el aceite esencial de orégano es un potencial antimicrobiano que se atribuyen por su alto contenido fenólico (Burt, 2007), donde sus componentes principales son: carvacrol, timol, seguido de p-cinemo,

α -terpineno, linalool, terpinen-4-ol (Gendy *et al.*, 2015). Al respecto Burt (2007), señala que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es atribuida a la perturbación de la membrana citoplasmática y la interrupción de la fuerza motriz de los protones del flujo de electrones del transporte activo y a la coagulación de los contenidos celulares, generando degradación de la pared celular, membrana citoplasmática y membrana proteica de los microorganismos.

En la Tabla 27; (Anexo 13), se observa el análisis de varianza del recuento viable de *Salmonella spp* presente en la carne de cuy adicionada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano; existe diferencia altamente significativa ($p < 0.05$), entre los valores de *Salmonella spp* viable para los tratamientos y tiempo, es decir que existe diferencia entre el tratamiento con diferentes concentraciones aceite esencial y la muestra control, así como para el tiempo de evaluación, con un 95 % de nivel de significancia; por lo que fue necesaria la realización de la prueba de comparación de Duncan, tal como se muestra en la Tabla 28.

En la Tabla 28 (Anexo 13), se observa la prueba de comparación Duncan para el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano y la muestra control con respecto a los resultados de *Salmonella spp* viable, que existe diferencias entre la carne de cuy de la muestra control presenta un incremento promedio hasta 4.38 ± 0.01 log ufc/g del crecimiento de la bacteria, indica claramente a mayor concentraciones de aceite esencial de orégano disminuyen el crecimiento bacteriano de *Salmonella spp*, donde se muestra a una concentración de 1,2% y 0.8 % AE de orégano siendo la mejor en la disminución del crecimiento microbiano a partir del día 8 siendo similares en la disminución de la carga microbiana, indica claramente, una función como medio protector contra la proliferación de *Salmonella spp*.

c) Evaluación de *Escherichia coli* O157:H7

En la Tabla 14, se presenta los resultados del recuento total de *Escherichia coli* O157:H7 viable analizado en la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0, 0.4, 0.8 y 1.2%), durante 12 días de almacenamiento a una temperatura de refrigeración (4°C).

Tabla 14. Recuento microbiano de *Escherichia coli* O157:H7 viable de la carne de cuy tratada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en log ufc/g.

Día	Concentraciones			
	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
0	4.00 ± 0.00 ^a			
2	3.17 ± 0.05 ^c	2.98 ± 0.06 ^b	2.98 ± 0.03 ^b	2.69 ± 0.09 ^a
4	3.14 ± 0.09 ^c	2.79 ± 0.09 ^b	2.72 ± 0.08 ^b	2.00 ± 0.00 ^a
6	3.08 ± 0.07 ^c	2.00 ± 0.00 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
8	2.97 ± 0.09 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
10	2.91 ± 0.09 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a
12	2.62 ± 0.03 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^a

n=3

AE : Aceite esencial

a, b, c, d : Prueba de comparación Duncan

De la misma manera se observa en todas las muestras de carne de cuy tienen una carga microbiana inicial de 4.00 ± 0.00 log ufc/g de *Escherichia coli* O157:H7. Las muestras del grupo control se observa a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento, disminuye la carga microbiana de *Escherichia coli* O157:H7 hasta llegar al día 12 a 2.62 ± 0.03 log ufc/g, igualmente observamos las muestras de carne de cuy tratadas con concentraciones de aceite esencial de orégano en 0.4%, 0.8% y 1.2% donde tienen una reducción de la carga microbiana, a partir del día 2 hasta el día 12.

Donde se observa que a los 12 días, de almacenamiento alcanzo hasta $1.00 \pm 0.00 \log \text{ ufc/g}$, $1.00 \pm 0.00 \log \text{ ufc/g}$ y $1.00 \pm 0.00 \log \text{ ufc/g}$ respectivamente. Las muestras tratadas con AE 0.8% y AE 1.2% muestran una población de *Escherichia coli* O157:H7 más bajos que las muestras del grupo control, durante el periodo de almacenamiento. Sin embargo las muestras tratadas con AE 0.4% disminuyen en menor población de *Escherichia coli* O157:H7 en comparación con las muestras del grupo control. La concentración AE 0.8% y AE 1.2% disminuyo la carga microbiana de *Escherichia coli* O157:H7, que van por debajo del nivel aceptable ($<2 \log \text{ ufc/g}$) a partir del día 6 hasta el final del almacenamiento (Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, 2014; Gudbjornsdóttir *et al.*, 2004).

Estos resultados son similares a los reportado por Shekarforousch *et al.* (2007) muestra en su investigación realizada en crecimiento y la supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne de pollo asado donde indica que los aceites esenciales de nuez moscada y orégano tuvieron una buena actividad antimicrobiana en la disminución de *Escherichia coli* O157:H7. Por otro lado Otero, Becerril, Santos *et al.* (2014), señala la evaluación de envases antimicrobianos contra *Escherichia coli* O157:H7 durante el almacenamiento en queso de oveja madurado con aceite esencial de orégano, donde disminuyó el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* O157:H7 durante su tiempo de almacenamiento. De manera similar Frangos *et al.*, (2010), menciona en su investigación el efecto del aceite de orégano en filetes de trucha en refrigeración, donde se trató con bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos resultados muestran un efecto en la disminución de *Enterobacteriaceae* durante el tiempo de almacenamiento.

Esto demuestra que el aceite esencial de orégano presentó actividad antimicrobiana contra la proliferación de *Escherichia coli* O157:H7. Además el aceite esencial de

orégano es un potencial antimicrobiano que se atribuyen por su alto contenido fenólico (Burt, 2007), donde sus componentes principales son: carvacrol, timol, seguido de p-cinemo, γ -terpineno, linalool, terpinen-4-ol (Gendy *et al.*, 2015). Al respecto Burt (2007), señala que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es atribuida a la perturbación de la membrana citoplasmática y la interrupción de la fuerza motriz de los protones del flujo de electrones del transporte activo y a la coagulación de los contenidos celulares, generando degradación de la pared celular, membrana citoplasmática y membrana proteica de los microorganismos. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha informado que las células que crecen en concentraciones de carvacrol, sintetizan los fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales (Reinders & Burt, 2003).

En la Tabla 29 (Anexo 14), se observa el análisis de varianza del recuento viable de *Escherichia coli* O157:H7 presente en la carne de cuy adicionada con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano; existe diferencia altamente significativa ($p < 0.05$), entre los valores de *Escherichia coli* O157:H7 viable para los tratamientos y tiempo, es decir que existe diferencia entre el tratamiento con diferentes concentraciones aceite esencial y la muestra control, así como para el tiempo de evaluación, con un 95 % de nivel de significancia; por lo que fue necesaria la realización de la prueba de comparación de Duncan, tal como se muestra en la Tabla 30.

En la Tabla 30 (Anexo 14), se observa la prueba de comparación Duncan para el efecto de las concentraciones de aceite esencial de orégano y la muestra control con respecto a los resultados de *Escherichia coli* O157:H7 viable, indica claramente a mayor concentración de aceite esencial de orégano disminuyen el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* O157:H7, donde se muestra a una concentración de 1,2% y 0.8 % AE de

orégano siendo la mejor en la disminución del crecimiento microbiano a partir del día 6 siendo similares en la disminución de la carga microbiana, indica claramente, una función como medio protector contra la proliferación de *Escherichia coli* O157:H7.

En la Tabla 15, se presenta los valores de K obtenidos por regresión lineal, también observamos los tiempos de vida predichos para carne de cuy en función a los valores de la carga microbiana log ufc/g de las muestras almacenadas, donde se observa que los valores hallados de K (reacciones de orden cero) son diferentes para cada muestra con *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 y en diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano; los valores de K representan la constante de velocidad de formación de microorganismos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7) por día, por tanto está relacionado directamente con la vida útil de la carne de cuy.

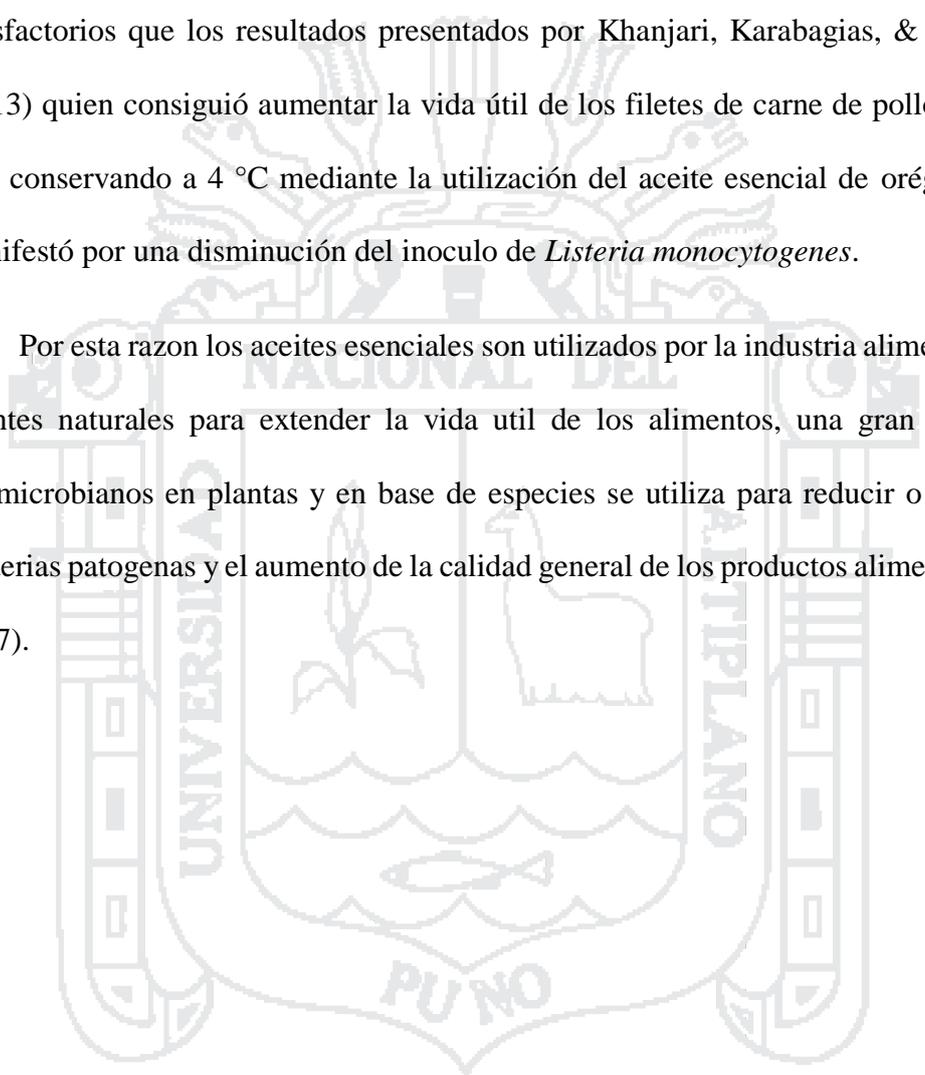
Tabla 15. Valores de K y tiempos de vida estimada para carne de cuy en función a los valores de la carga microbiana log ufc/g.

Microorganismos	Concentraciones de AE orégano	Valores de K	Tiempo de vida (Días)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Control	0.0666	11.11
	AE 0.4 %	0.0593	12.98
	AE 0.8 %	0.084	13.93
	AE 1.2 %	0.247	20.24
<i>Salmonella spp</i>	Control	0.0310	12.25
	AE 0.4 %	0.061	13.44
	AE 0.8 %	0.321	19.37
	AE 1.2 %	0.289	19.72
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Control	0.0863	15.99
	AE 0.4 %	0.34	17.64
	AE 0.8 %	0.249	20.08
	AE 1.2 %	0.229	21.83

AE: Aceite esencial

De lo anteriormente expuesto de la Tabla 15, se puede inferir que se logró prolongar el tiempo de vida estimada en *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* *Escherichia coli* O157:H7 en 20, 20 y 22 días respectivamente; la carne de cuy tratada con 1.2% AE de orégano, estos datos registrados pueden ser considerados mucho más satisfactorios que los resultados presentados por Khanjari, Karabagias, & Kontaminas (2013) quien consiguió aumentar la vida útil de los filetes de carne de pollo crudo en 6 días conservando a 4 °C mediante la utilización del aceite esencial de orégano, que se manifestó por una disminución del inóculo de *Listeria monocytogenes*.

Por esta razón los aceites esenciales son utilizados por la industria alimentaria como agentes naturales para extender la vida útil de los alimentos, una gran variedad de antimicrobianos en plantas y en base de especies se utiliza para reducir o eliminar las bacterias patógenas y el aumento de la calidad general de los productos alimenticios (Burt 2007).



CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones.

- La Concentración Mínima Inhibitoria encontrada por el método de macrodilución en caldo fue 3.5 $\mu\text{g/ml}$ para *Escherichia coli* O157:H7, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ para *Salmonella spp* y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ para *Listeria monocytogenes*.
- La concentración de aceite esencial de orégano afectó significativamente en la reducción del crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* evaluadas en carne de cuy almacenadas a 4°C por 12 días. A medida que se incrementa la concentración, la reducción de crecimiento aumenta para cada tiempo de almacenamiento, esta se intensifica a tiempos mayores (6, 8 y 10 días). A una concentración de 1.2% al día 12 de almacenamiento la reducción de crecimiento bacteriano fue 75 % en *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7 comparados con la muestra control.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de aceites esenciales de otras especies vegetales nativas, como conservante natural en diferentes productos.
- Realizar trabajos de investigación con el aceite esencial de orégano en diferentes bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS).



BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35, 177-183.
- Albado, E., Saez, G., & Grabiell, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*, 12, 16 -19.
- Alcazar, J. (2002). Diccionario Tecnico de Industrias Alimentarias. 2da Edición. Cusco - Peru.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., & Mitaku, S. C. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168 - 4170.
- Allende, A., Hald, T., Johannessen, G. S., McLauchlin, J., Nguyen-El, C., & Uyttendaele, M. (2013). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *Journal European Food Safety Authority*, 11(1), 3025.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. essential oils from steam/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4364 - 4370.

- Arcila, C. C., Loarca, G., Lecona, S., & González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100 - 111.
- Argote, F. (1999). Estudio de factibilidad para el montaje de una planta procesadora de carne de cuy empacada en bandeja a vacío en el Municipio de Tangua Nariño (Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial). Universidad de Nariño, Colombia.
- Barancelli, G. V., Hernández, M. L., & Contreras, C. J. (2011). Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 1 - 11.
- Bastos, M. E., Damé, L. F., Souza, L. d., Almeida, D. B., Alves, M. R., & Braga, J. R. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3), 260-266.
- Bermudez, M. (2009). Uso industrial de plantas aromaticas medicinales (Tesis para obtener el título de Ingeniero de Montes). Universidad Politecnica de Madrid, España.
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Journal Procedia Food Science*, 5, 18-21.

- Burt, S. A. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in foods. In *Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health*, 978(90), 393-4661.
- Campoverde, P. N. S. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo (Tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Camus, J. A., & Trujillo, M. A. (2011). Contribución a la química de los aceites esenciales provenientes del oregano. *Revista Boliviana de Química*, 28, 1-5.
- Collura, A. M., & Storti, N. (1971). Manual para el cultivo de plantas aromáticas. Editorial Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.
- Coma, J. (2001). Control de *Salmonella* en Carne de Porcino: Efecto de la Alimentación Animal. *XVII Curso de Especialización FEDNA*.
- Durango, J., Arrieta, G., & Mattar, S. (2004). Presencia de *Salmonella spp.* En un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica*, 24, 89-96.
- Fernández, J. (2007). Manual para la crianza y comercialización de cuyes. Perú.
- Franca, T. F. (2013). Estudo da presença de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais pela técnica neutrográfica (Doctoral dissertation). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

- Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. (2010). Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiology*, 27, 115–121.
- Garcia, H. (1988). *Esencias naturales*. Ediciones Aguilar. S. A. Madrid – España.
- Garrido, M. D., Bañón, S., & Álvarez, D. (2005). Medida del pH. En: Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes. Monografías INIA, Madrid. *Journal of Animal Science* 77(1), 267.
- Gendy, A. N. E., Leonardi, M., Mugnaini, L., Bertelloni, F., Ebani, V. V., Nardoni, S., Mancianti, F., Hendawy, S., Omer, E., & Pistelli, L. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Journal Industrial Crops and Products*, 67, 201–207.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., & Chatzopoulou, P. S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 175-180.
- Gudbjornsdóttir, B., Suihko, M.-L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjoberg, A.-M., Niclasen, O., & Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21, 217–225.
- Hilvay, L. R. (2015). Efecto de los aceites esenciales de limón (*Citrus limon*), albahaca (*Ocimum basilicum L.*) y orégano (*Origanum vulgare*), en la conservación de la

carne de cuy (*Cavia porcellus*) (Titulo para obtener de Ingeniero de Alimentos).

Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.

Hirasa, K., & Takemasa, M. (2002). Ciencia y Tecnología de las Especies. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.

INIA, (2010). Composición química y nutrición de la carne de cuy. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria, Ministerio de Agricultura, Estación Experimental, ILLPA - Puno, Perú.

Jara, J. P. (2007). Efecto del pH Sobre la Conservación de Carne de Bovino de Corte Oscuro (DFD) Envasada al Vacío, Almacenada a 0°C (Titulo para obtener de Ingeniero de Alimentos). Universidad Austral de Chile.

Khanjari, A., Karabagias, I., & Kontaminas, M. (2013). Combined effect of N, O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control 1 de *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 94-99.

Lagos, E. R. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis (Tesis para obtener de Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú.

Martinez, A. (2001). Aceites Esenciales. Facultad Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellin.

Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., & Álvarez, E. E. (2006). Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*, 38, 38-40.

- Mateauda, J. P. (2013). Estudio de la microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío (Tesis para obtener licenciatura en Bioquímica). Universidad de la Republica, Uruguay.
- Moreno, R. (1989). El cuy. (Segunda Edición Lima). Universidad Agraria la Molina, Perú.
- Nakandakari, L., Gutiérrez, E., Chauca, L., & Valencia, R. (2014). Medición del pH intramuscular del cuy (*Cavia porcellus*) durante las primeras 24 horas post beneficio tradicional. *Salud y tecnología veterinaria*, 2, 99-105.
- Ocares, M. A. (2012). Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* (Título para obtener Ingeniero en Alimentos). Universidad Austral de Chile.
- Ochoa, L. H., Gonzales, A. G., Mendez, N. G., Castellanos, L. N. M., & Ramos, A. Q. (2011). Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 455 - 463.
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J. A., Calleja, J. M. R., Nerín, C., López, M.-L. G., & Gonzales, A. G. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, 42, 296-302.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7,

Salmonella Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.
Food Control, 18, 414–420.

Perez, N. L., & Sigaran, M. P. (2012). Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos (Doctoral dissertation). Universidad de el Salvador, Argentina.

Pesavento, G., Calónico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Martino, M. C. D., Nostro, A. L., & Addona, R. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54 188 -199.

Primo, E. (1998). Química de los alimentos. Editorial Síntesis, S.A. Madrid, España.

Ramos, S. P. (2014). Mejoramiento de la textura de la carne en productos marinados (Tesis para obtener título de Ingeniero en Industria Alimentarias). Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión Huacho, Perú.

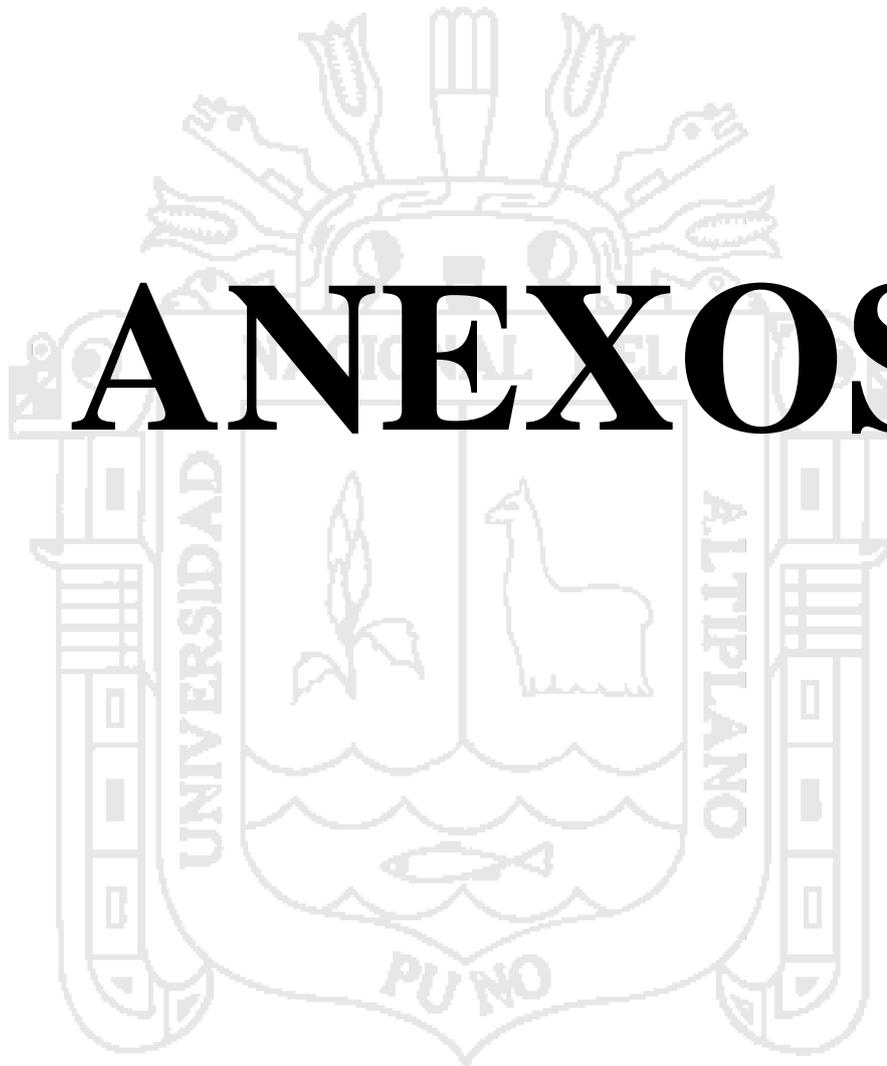
Raygoza, M. d. J. (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos esenciales de orégano (*Lippia graveolens*), zacate limón (*Cymbopogón citratus*) y ajo (*Allium sativum*), frente *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli* (Tesis para obtener Licenciatura en Biología). Universidad de Guadalajara, Mexico.

Rea, V. G. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) como potencial bioconservador en la carne de trucha (Tesis para obtener título de Bioquímico Farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

- Reinders, R. D., & Burt, S. A. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162–167.
- Rodríguez, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Journal Ra Ximbai*, 7, 153 - 170.
- Sánchez, B., & Palencia, E. (2010). Infecciones por *Listeria*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(50), 368-372.
- Sarria, J. (2005). Producción comercial de cuyes (Folleto). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú.
- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un Peligro Latente Para la Industria Alimentaria. *Journal Agro Sur*, 37(1), 1-8.
- Shekarforoush, S. S., Nazer, A. H. K., Firouzi, R., Rostami, M., & Pérez, C. J. E. (2007). Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran. *Food Control*, 18, 1428–1433.
- Stella, L., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Journal Scientia et Technica*, 42, 263-268.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987-6000.

- Tuapanta, R. A. (2011). Caracterización de la producción de cuyes para la comercialización asociativa en la asociación “PAKUSUMI” de la Parroquia pasa de la Provincia de Tungurahua (Tesis para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista). Universidad Estatal de Bolivar, Ecuador.
- Vargas, M., Sánchez, L., González, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Engineering reviews*, 3(1), 1-16.
- Varnam, A., & Sutherland, J. (1998). Carne y Productos Carnicol, Tecnología, Química y Microbiología. Zaragoza: Acribia S.A.
- Villavicencio, B. (2009). Evaluación de tres dietas alimenticias (maralfalfa, alfalfa y mezcla de las dos) en cuyes de 15 días hasta el engorde (4 meses) en el CEYPSA (Tesis para obtener Zootecnista). Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.
- Zekaria, D. (2007). Aceites esenciales, Una alternativa de antimicrobianos. Editorial Cailer S. A. Zaragoza, España.

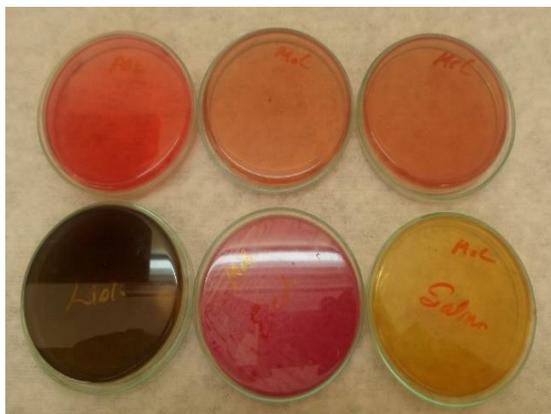
ANEXOS



ANEXO 1

PANEL FOTOGRÁFICO DE CONSERVACIÓN DE CEPAS

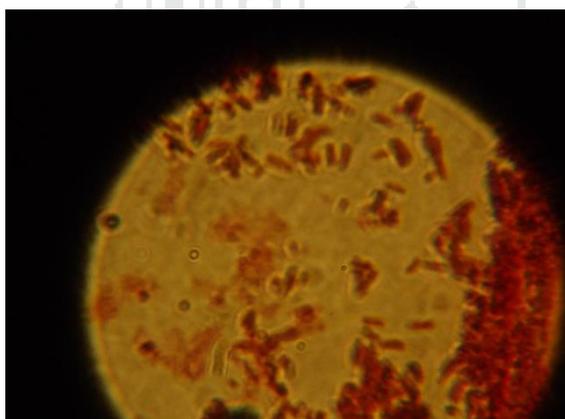
Escherichia coli O157:H7, *Listeria monocytogenes* Y *Salmonella* spp.



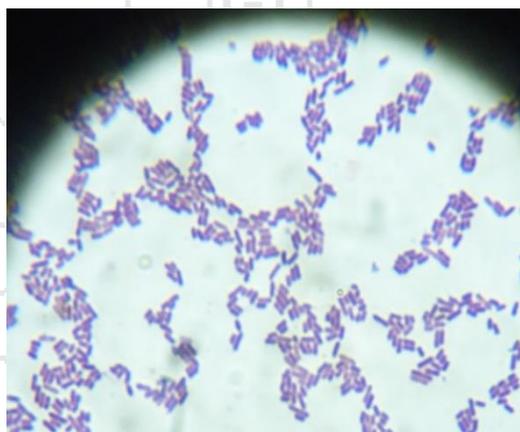
Repique de cepas x 24 horas en agares PALCAM y Mc conkey



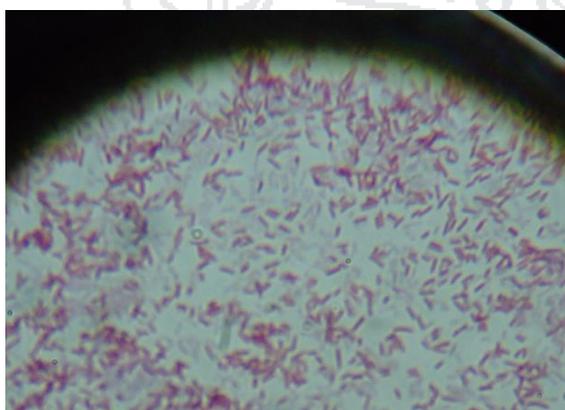
Observacion en microscopio



Tincion gram de *Escherichia coli* O157:H7



Tincion gram de *Listeria monocytogenes*



Tincion gram de *Salmonell* spp.



Cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. conservadas en agar sangre.

ANEXO 2

PANEL FOTOGRÁFICO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AE DE ORÉGANO SOBRE *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* Y *Salmonella spp.*



Aceite esencial de orégano



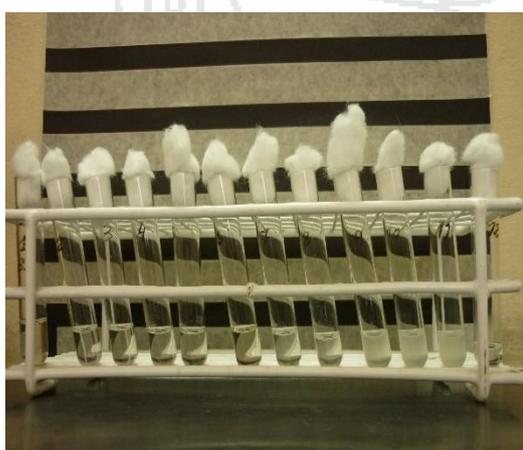
Escala de Mc Farland



Tubos esterilizados para la preparación de la CMI.



Preparación de las diluciones para la CMI.



Resultados de *Escherichia coli* O157:H7 en tubos de ensayos esterilizados



Resultados de *Salmonella spp.* en tubos de ensayo esterilizados



Resultados de *Listeria monocytogenes* en
tubos de ensayo esterilizados



ANEXO 3

PANEL FOTOGRÁFICO DEL TRATAMIENTO CON ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO (*Origanum vulgare*), EN LA CARNE DE CUY



Masajeado la carne de cuy con AE de
orégano



Empacado al vacío



Muestras de carne de cuy con AE de
orégano envasado al vacío



Muestras de carne de cuy con AE de
orégano

ANEXO 4

PANEL FOTOGRÁFICO DE RECUENTO VIABLE DE *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*



Pesado de la muestra de carne de cuy



Licuada de la muestra



Muestras licuadas de diferentes concentraciones de AE de orégano



Dilución de la muestra de carne de cuy



Plaqueo de los agares en placas Petri



Codificación de placas



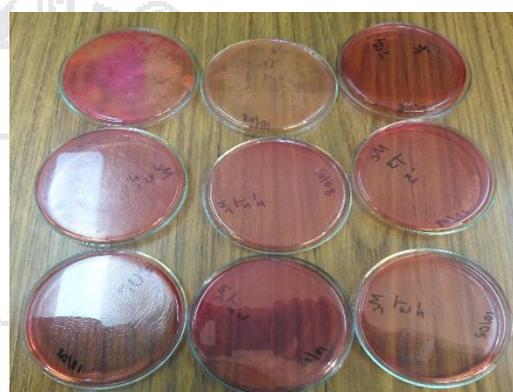
Incubación de placas



Conteo de ufc en placas de *Listeria monocytogenes*



Conteo de ufc en placas de *Salmonella spp.*



Conteo de ufc en placas de *Escherichia coli* O157:H7



Conteo de ufc en él cuenta colonias

ANEXO 5

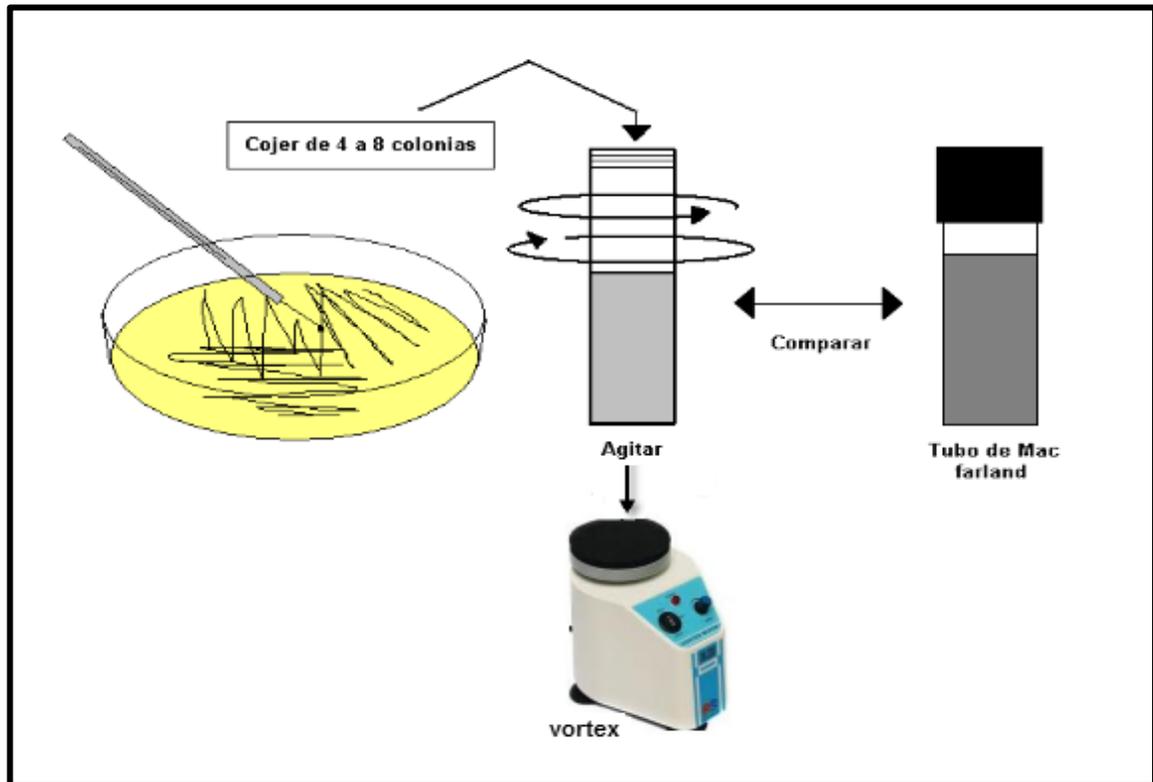
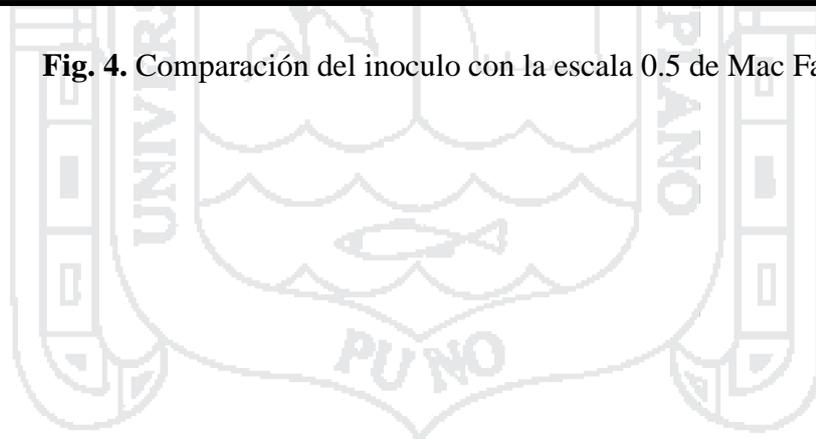


Fig. 4. Comparación del inoculo con la escala 0.5 de Mac Farland.



ANEXO 6

RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA SOBRE
CEPAS *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*

Tabla 16. Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre *Escherichia coli* O157:H7.

Tubos	Concentración de aceite esencial de orégano ($\mu\text{g/ml}$)	Presencia de Turbidez			
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
1	128	-	-	-	-
2	64	-	-	-	-
3	32	-	-	-	-
4	16	-	-	-	-
5	8	-	-	-	-
6	4	+	+	-	+
7	2	+	+	+	+
8	1	+	+	+	+
9	0.5	+	+	+	+
10	0.25	+	+	+	+
11	C. I.	+	+	+	+
12	C. E.	-	-	-	-

(+): Presencia de Turbidez; (-): No hay presencia de turbidez, C.I.: Control del inóculo, C.E.: Control de esterilidad.

Tabla 17. Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre *Salmonella spp.*

Tubos	Concentración de aceite esencial de orégano (µg/ml)	Presencia de Turbidez			
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
1	128	-	-	-	-
2	64	-	-	-	-
3	32	-	-	-	-
4	16	-	-	-	-
5	8	-	-	-	-
6	4	+	-	-	-
7	2	+	+	+	+
8	1	+	+	+	+
9	0.5	+	+	+	+
10	0.25	+	+	+	+
11	C. I.	+	+	+	+
12	C. E.	-	-	-	-

(+): Presencia de Turbidez; (-): No hay presencia de turbidez, C.I.: Control del inculo, C.E.: Control de esterilidad.

Tabla 18. Lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre *Listeria monocytogenes.*

Tubos	Concentración de aceite esencial de orégano (µg/ml)	Presencia de Turbidez			
		replica 1	replica 2	replica 3	replica 4
1	128	-	-	-	-
2	64	-	-	-	-
3	32	-	-	-	-
4	16	-	-	-	-
5	8	-	-	-	-
6	4	-	-	-	-
7	2	+	-	+	-
8	1	+	+	+	+
9	0.5	+	+	+	+
10	0.25	+	+	+	+
11	C. I.	+	+	+	+
12	C. E.	-	-	-	-

(+): Presencia de Turbidez; (-): No hay presencia de turbidez, C.I.: Control del inculo, C.E.: Control de esterilidad.

ANEXO 7

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE pH

Listeria monocytogenes pH – tiempo (Días)

Tiempo	R	Control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
		Ph	pH	pH	pH
0 DÍAS	1	6.82	6.82	6.84	6.82
	2	6.85	6.79	6.75	6.89
	3	6.78	6.78	6.78	6.78
2 DÍAS	1	6.82	6.83	6.89	6.89
	2	6.79	6.79	6.71	6.87
	3	6.85	6.84	6.77	6.78
4 DÍAS	1	6.88	6.81	6.77	6.89
	2	6.79	6.79	6.81	6.76
	3	6.75	6.87	6.79	6.78
6 DÍAS	1	6.81	6.69	6.76	6.76
	2	6.89	6.82	6.81	6.75
	3	6.83	6.8	6.69	6.82
8 DÍAS	1	6.88	6.68	6.7	6.82
	2	6.84	6.83	6.69	6.72
	3	6.81	6.79	6.75	6.79
10 DÍAS	1	6.79	6.77	6.73	6.72
	2	6.79	6.7	6.69	6.69
	3	6.88	6.69	6.69	6.77
12 DÍAS	1	6.79	6.75	6.68	6.69
	2	6.84	6.69	6.69	6.71
	3	6.81	6.68	6.72	6.65

Salmonella spp pH – tiempo (Días)

Tiempo	R	control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
		pH	pH	pH	pH
0 DÍAS	1	6.69	6.78	6.83	6.85
	2	6.77	6.89	6.71	6.71
	3	6.86	6.65	6.81	6.78
2 DÍAS	1	6.76	6.89	6.67	6.8
	2	6.89	6.64	6.89	6.85
	3	6.85	6.75	6.76	6.69
4 DÍAS	1	6.74	6.74	6.65	6.89
	2	6.88	6.68	6.89	6.79
	3	6.89	6.88	6.75	6.68
6 DÍAS	1	6.94	6.73	6.75	6.69
	2	6.76	6.77	6.69	6.76
	3	6.9	6.85	6.87	6.9
8 DÍAS	1	6.77	6.74	6.78	6.91
	2	6.89	6.89	6.7	6.72
	3	6.85	6.68	6.85	6.68
10 DÍAS	1	6.92	6.71	6.69	6.72
	2	6.89	6.85	6.78	6.82
	3	6.75	6.79	6.87	6.78
12 DÍAS	1	6.94	6.79	6.67	6.87
	2	7.02	6.89	6.79	6.73
	3	6.76	6.62	6.89	6.7

Escherichia coli O157:H7 pH – tiempo (Días)

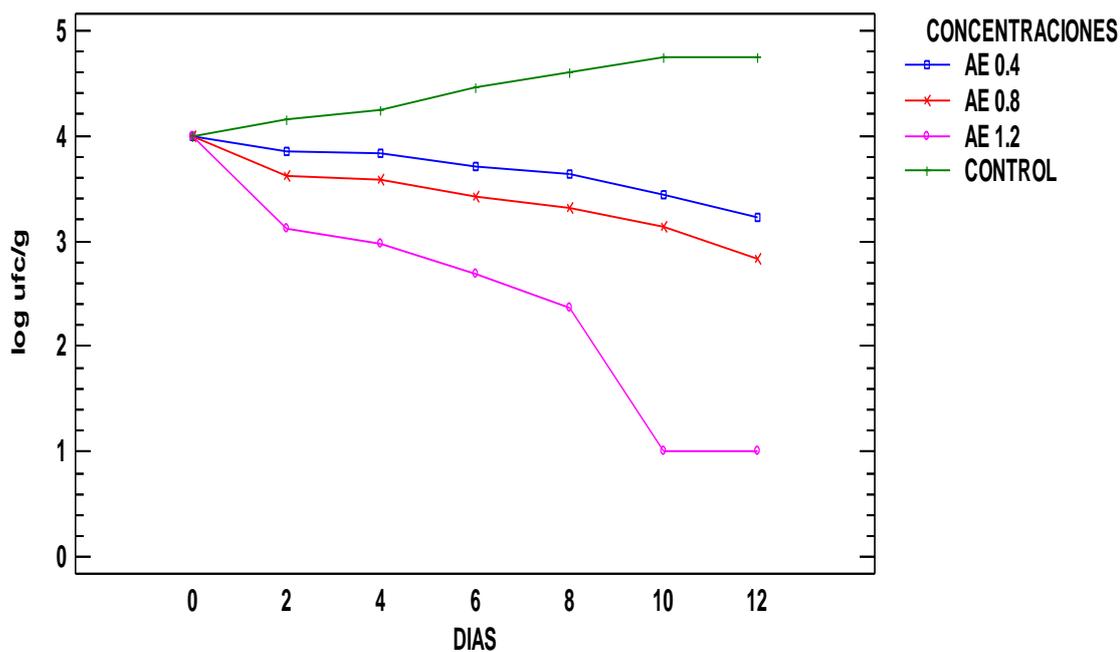
Tiempo	R	control	AE 0.4%	AE 0.8%	AE 1.2%
		pH	pH	pH	pH
0 DÍAS	1	6.85	6.73	6.81	6.89
	2	6.69	6.87	6.81	6.78
	3	6.79	6.79	6.75	6.68
2 DÍAS	1	6.71	6.89	6.69	6.77
	2	6.80	6.77	6.88	6.69
	3	6.89	6.75	6.89	6.89
4 DÍAS	1	6.81	6.93	6.69	6.87
	2	6.72	6.68	6.69	6.65
	3	6.91	6.78	6.88	6.72
6 DÍAS	1	6.82	6.79	6.78	6.69
	2	6.75	6.77	6.89	6.68
	3	6.89	6.87	6.70	6.88
8 DÍAS	1	6.82	6.87	6.79	6.89
	2	6.72	6.69	6.88	6.78
	3	6.87	6.78	6.69	6.68
10 DÍAS	1	6.92	6.89	6.88	6.81
	2	6.68	6.78	6.85	6.89
	3	6.87	6.77	6.69	6.69
12 DÍAS	1	6.70	6.78	6.89	6.79
	2	6.77	6.73	6.68	6.68
	3	6.94	6.88	6.83	6.89

ANEXO 8

FIGURAS DE BACTERIAS PATOGENAS

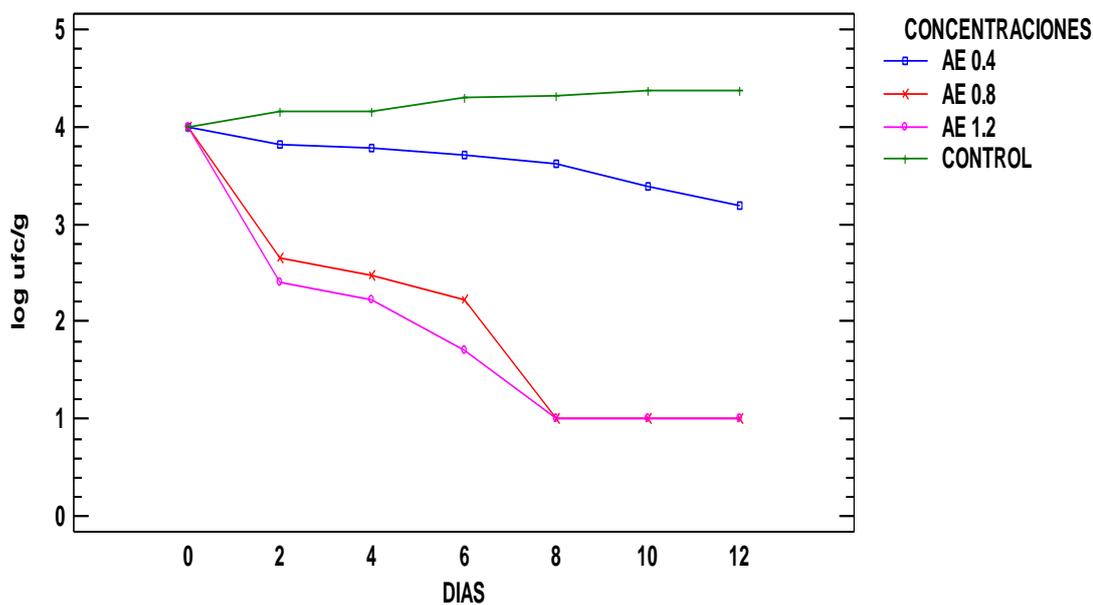
Listeria monocytogenes VIABLES – TIEMPO (Días)

Gráfico de Interacciones



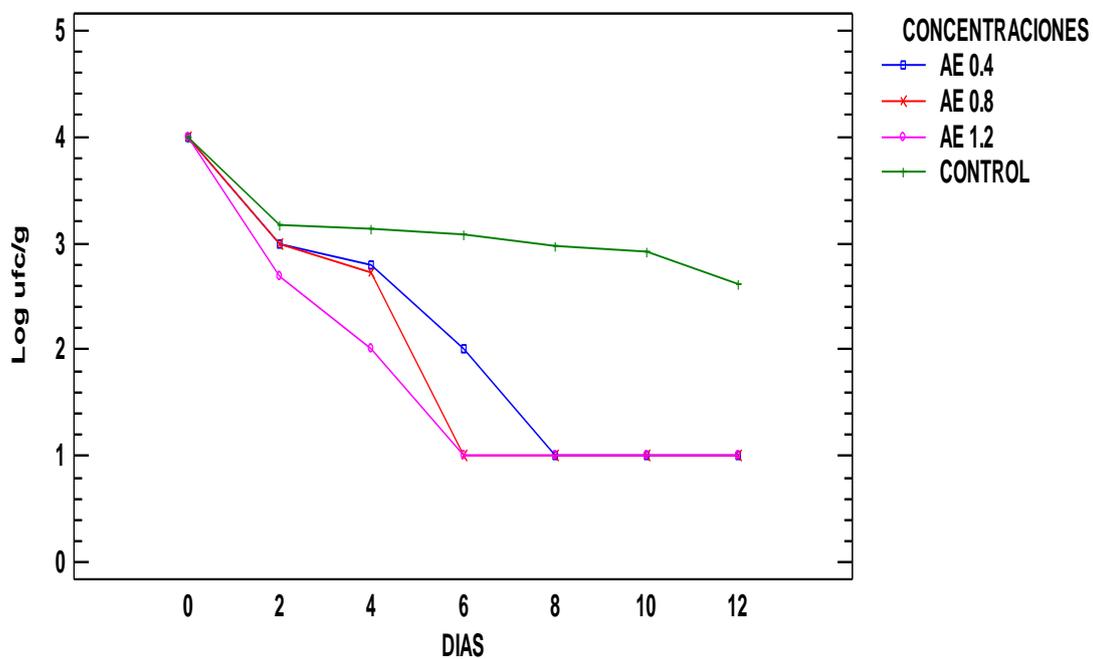
Salmonella spp. VIABLES – TIEMPO (Días)

Gráfico de Interacciones



Escherichia coli O157:H7 VIABLES – TIEMPO (Días)

Gráfico de Interacciones



ANEXO 9

TABLAS DE ANVA Y DUNCAN DEL pH (*Listeria monocytogenes*)

Tabla 19. ANVA del pH de la carne de cuy con *Listeria monocytogenes*.

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados Tipo III	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.	
Modelo corregido	Día 0	0,003 ^a	3	0,001	0,589	0,639	
	Día 2	0,005 ^b	3	0,002	0,479	0,706	
	Día 4	0,002 ^c	3	0,001	0,197	0,896	
	Día 6	0,014 ^d	3	0,005	1,606	0,263	
	Día 8	0,026 ^e	3	0,009	3,126	0,088	
	Día 10	0,025 ^f	3	0,008	4,905	0,032	
	Día 12	0,032 ^g	3	0,011	12,440	0,002	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Día 0	0,003	3	0,001	0,589	0,639
		Día 2	0,005	3	0,002	0,479	0,706
		Día 4	0,002	3	0,001	0,197	0,896
		Día 6	0,014	3	0,005	1,606	0,263
		Día 8	0,026	3	0,009	3,126	0,088
Día 10		0,025	3	0,008	4,905	0,032	
Día 12		0,032	3	0,011	12,440	0,002	
Error		Día 0	0,014	8	0,002		
		Día 2	0,027	8	0,003		
		Día 4	0,023	8	0,003		
		Día 6	0,023	8	0,003		
		Día 8	0,022	8	0,003		
	Día 10	0,014	8	0,002			
Total	Día 12	0,007	8	0,001			
	Día 0	556,258	12				
	Día 2	558,044	12				
	Día 4	556,129	12				
	Día 6	552,608	12				
	Día 8	550,855	12				
	Día 10	545,574	12				
	Día 12	542,746	12				
	Total corregida	Día 0	0,017	11			
		Día 2	0,032	11			
		Día 4	0,025	11			
		Día 6	0,037	11			
Día 8		0,048	11				
Día 10		0,038	11				
	Día 12	0,039	11				

Tabla 20. Prueba de comparación Duncan para del pH de la carne de cuy (*Listeria monocytogenes*) con respecto a los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento.

Tratamientos	N	Días						
		0	2	4	6	8	10	12
AE 1.2	3	a	a	a	a	ab	a	a
AE 0.8	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.4	3	a	a	a	a	ab	a	a
CONTROL	3	a	a	a	a	b	a	a



ANEXO 10

TABLAS DE ANVA Y DUNCAN DEL pH (*Salmonella spp.*)

Tabla 21. ANVA del pH de la carne de cuy con *Salmonella spp.*

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados Tipo III	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Modelo corregido	Día 0	0,000 ^a	3	7,500E-005	0,010	0,999
	Día 2	0,009 ^b	3	0,003	0,319	0,812
	Día 4	0,010 ^c	3	0,003	0,318	0,812
	Día 6	0,018 ^d	3	0,006	0,726	0,565
	Día 8	0,009 ^e	3	0,003	0,348	0,792
	Día 10	0,013 ^f	3	0,004	0,707	0,574
	Día 12	0,041 ^g	3	0,014	0,969	0,454
<i>Salmonella spp</i>	Día 0	0,000	3	7,500E-005	0,010	0,999
	Día 2	0,009	3	0,003	0,319	0,812
	Día 4	0,010	3	0,003	0,318	0,812
	Día 6	0,018	3	0,006	0,726	0,565
	Día 8	0,009	3	0,003	0,348	0,792
	Día 10	0,013	3	0,004	0,707	0,574
	Día 12	0,041	3	0,014	0,969	0,454
Error	Día 0	0,061	8	0,008		
	Día 2	0,078	8	0,010		
	Día 4	0,086	8	0,011		
	Día 6	0,065	8	0,008		
	Día 8	0,072	8	0,009		
	Día 10	0,048	8	0,006		
	Día 12	0,113	8	0,014		
Total	Día 0	551,276	12			
	Día 2	552,794	12			
	Día 4	553,074	12			
	Día 6	555,099	12			
	Día 8	553,059	12			
	Día 10	554,532	12			
	Día 12	555,987	12			
Total corregida	Día 0	0,062	11			
	Día 2	0,087	11			
	Día 4	0,097	11			
	Día 6	0,083	11			
	Día 8	0,082	11			
	Día 10	0,060	11			
	Día 12	0,155	11			

Tabla 22. Prueba de comparación Duncan del pH de la carne de cuy (*Salmonella spp*) con respecto a los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento.

Tratamientos	N	Días						
		0	2	4	6	8	10	12
AE 1.2	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.8	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.4	3	a	a	a	a	a	a	a
CONTROL	3	a	a	a	a	a	a	a



ANEXO 11

TABLAS DE ANVA Y DUNCAN DEL pH (*Escherichia coli* O157:H7)

Tabla 23. ANVA del pH de la carne de cuy con *Escherichia coli* O157:H7.

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados Tipo III	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.	
Modelo corregido	Día 0	0,001 ^a	3	0,000	0,038	0,990	
	Día 2	0,002 ^b	3	0,001	0,074	0,972	
	Día 4	0,010 ^c	3	0,003	0,257	0,854	
	Día 6	0,009 ^d	3	0,003	0,390	0,764	
	Día 8	0,001 ^e	3	0,000	0,038	0,989	
	Día 10	0,001 ^f	3	0,000	0,037	0,990	
	Día 12	0,000 ^g	3	0,000	0,014	0,997	
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Día 0	0,001	3	0,000	0,038	0,990
		Día 2	0,002	3	0,001	0,074	0,972
		Día 4	0,010	3	0,003	0,257	0,854
		Día 6	0,009	3	0,003	0,390	0,764
		Día 8	0,001	3	0,000	0,038	0,989
Día 10		0,001	3	0,000	0,037	0,990	
Día 12		0,000	3	0,000	0,014	0,997	
Error		Día 0	0,047	8	0,006		
		Día 2	0,073	8	0,009		
		Día 4	0,099	8	0,012		
		Día 6	0,059	8	0,007		
		Día 8	0,068	8	0,009		
	Día 10	0,082	8	0,010			
	Día 12	0,088	8	0,011			
	Total	Día 0	552,754	12			
		Día 2	555,227	12			
		Día 4	551,323	12			
		Día 6	553,724	12			
		Día 8	553,047	12			
Día 10		556,596	12				
Día 12		554,424	12				
Total corregida		Día 0	0,048	11			
		Día 2	0,075	11			
		Día 4	0,109	11			
		Día 6	0,068	11			
		Día 8	0,069	11			
	Día 10	0,083	11				
	Día 12	0,088	11				

Tabla 24. Prueba de comparación Duncan del pH de la carne de cuy (*Escherichia coli* O157:H7) con respecto a los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento.

Tratamientos	N	Días						
		0	2	4	6	8	10	12
AE 1.2	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.8	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.4	3	a	a	a	a	a	a	a
CONTROL	3	a	a	a	a	a	a	a



ANEXO 12

TABLAS DE ANVA Y DUNCAN de *Listeria monocytogenes* VIABLE

Tabla 25. ANVA de *Listeria monocytogenes* presente en la carne de cuy con AE.

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados Tipo III	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.	
Modelo corregido	Día 0	0,000 ^a	3	0,000	.	.	
	Día 2	1,737 ^b	3	0,579	168,216	0,000	
	Día 4	2,573 ^c	3	0,858	1094,766	0,000	
	Día 6	4,835 ^d	3	1,612	521,290	0,000	
	Día 8	7,735 ^e	3	2,578	674,047	0,000	
	Día 10	21,612 ^f	3	7,204	2245,447	0,000	
	Día 12	21,260 ^g	3	7,087	1494,557	0,000	
	Día 0	0,000	3	0,000	.	.	
	Día 2	1,737	3	0,579	168,216	0,000	
	Día 4	2,573	3	0,858	1094,766	0,000	
	Día 6	4,835	3	1,612	521,290	0,000	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Día 8	7,735	3	2,578	674,047	0,000
Día 10		21,612	3	7,204	2245,447	0,000	
Día 12		21,260	3	7,087	1494,557	0,000	
Día 0		0,000	8	0,000			
Día 2		0,028	8	0,003			
Día 4		0,006	8	0,001			
Día 6		0,025	8	0,003			
Día 8		0,031	8	0,004			
Día 10		0,026	8	0,003			
Día 12		0,038	8	0,005			
Error		Día 0	192,000	12			
		Día 2	164,420	12			
	Día 4	163,180	12				
	Día 6	158,227	12				
	Día 8	153,160	12				
	Día 10	135,413	12				
	Día 12	125,728	12				
	Día 0	0,000	11				
	Día 2	1,764	11				
	Día 4	2,579	11				
	Día 6	4,860	11				
	Día 8	7,765	11				
Total corregida	Día 10	21,638	11				
	Día 12	21,298	11				

Tabla 26. Prueba de comparación Duncan de *Listeria monocytogenes* presente en la carne de cuy con AE con respecto a los tratamientos a través del tiempo.

Tratamientos	N	Días						
		0	2	4	6	8	10	12
AE 1.2	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.8	3	a	b	b	b	b	b	b
AE 0.4	3	a	c	c	c	c	c	c
CONTROL	3	a	d	d	d	d	d	d



ANEXO 13

TABLAS DE ANVA Y DUNCAN de *Salmonella spp* VIABLE

Tabla 27. ANVA de *Salmonella spp* presente en la carne de cuy con AE.

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados Tipo III	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.	
Modelo corregido	Día 0	0,000 ^a	3	0,000	.	.	
	Día 2	6,693 ^b	3	2,231	568,396	0,000	
	Día 4	8,179 ^c	3	2,726	1022,317	0,000	
	Día 6	13,404 ^d	3	4,468	3481,565	0,000	
	Día 8	27,138 ^e	3	9,046	3667,342	0,000	
	Día 10	26,324 ^f	3	8,775	14039,360	0,000	
	Día 12	25,337 ^g	3	8,446	19122,384	0,000	
	<i>Salmonella spp</i>	Día 0	0,000	3	0,000	.	.
		Día 2	6,693	3	2,231	568,396	0,000
		Día 4	8,179	3	2,726	1022,317	0,000
		Día 6	13,404	3	4,468	3481,565	0,000
		Día 8	27,138	3	9,046	3667,342	0,000
Día 10		26,324	3	8,775	14039,360	0,000	
Día 12		25,337	3	8,446	19122,384	0,000	
Error		Día 0	0,000	8	0,000		
		Día 2	0,031	8	0,004		
		Día 4	0,021	8	0,003		
		Día 6	0,010	8	0,001		
		Día 8	0,020	8	0,002		
	Día 10	0,005	8	0,001			
	Día 12	0,004	8	0,000			
	Total	Día 0	192,000	12			
		Día 2	133,734	12			
		Día 4	127,774	12			
		Día 6	119,920	12			
		Día 8	101,161	12			
Día 10		97,772	12				
Día 12		93,934	12				
Total corregida		Día 0	0,000	11			
		Día 2	6,724	11			
		Día 4	8,200	11			
		Día 6	13,414	11			
		Día 8	27,158	11			
	Día 10	26,329	11				
	Día 12	25,341	11				

Tabla 28. Prueba de comparación Duncan de *Salmonella spp* presente en la carne de cuy con AE con respecto a los tratamientos a través del tiempo.

Tratamientos	N	Días						
		0	2	4	6	8	10	12
AE 1.2	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.8	3	a	b	b	b	a	a	a
AE 0.4	3	a	c	c	c	b	b	b
CONTROL	3	a	d	d	d	c	c	c



ANEXO 14

TABLAS DE ANVA Y DUNCAN PARA *Escherichia coli* O157:H7 VIABLE

Tabla 29. ANVA de *Escherichia coli* O157:H7 presente en la carne de cuy con AE.

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados Tipo III	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.	
Modelo corregido	Día 0	0,000 ^a	3	0,000	.	.	
	Día 2	0,349 ^b	3	0,116	30,599	0,000	
	Día 4	2,062 ^c	3	0,687	122,012	0,000	
	Día 6	8,864 ^d	3	2,955	2272,923	0,000	
	Día 8	8,762 ^e	3	2,921	1436,328	0,000	
	Día 10	8,266 ^f	3	2,755	1338,563	0,000	
	Día 12	5,881 ^g	3	1,960	9409,000	0,000	
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Día 0	0,000	3	0,000	.	.
		Día 2	0,349	3	0,116	30,599	0,000
		Día 4	2,062	3	0,687	122,012	0,000
		Día 6	8,864	3	2,955	2272,923	0,000
		Día 8	8,762	3	2,921	1436,328	0,000
Día 10		8,266	3	2,755	1338,563	0,000	
Día 12		5,881	3	1,960	9409,000	0,000	
Error		Día 0	0,000	8	0,000		
		Día 2	0,030	8	0,004		
		Día 4	0,045	8	0,006		
		Día 6	0,010	8	0,001		
		Día 8	0,016	8	0,002		
	Día 10	0,016	8	0,002			
Total	Día 12	0,002	8	0,000			
	Día 0	192,000	12				
	Día 2	105,341	12				
	Día 4	87,227	12				
	Día 6	46,470	12				
	Día 8	35,538	12				
	Día 10	34,537	12				
	Día 12	29,543	12				
	Total corregida	Día 0	0,000	11			
		Día 2	0,379	11			
		Día 4	2,107	11			
		Día 6	8,875	11			
Día 8		8,778	11				
	Día 10	8,282	11				
	Día 12	5,882	11				

Tabla 30. Prueba de comparación Duncan de *Escherichia coli* O157:H7 presente en la carne de cuy con AE con respecto a los tratamientos a través del tiempo.

tratamientos	N	Días						
		0	2	4	6	8	10	12
AE 1.2	3	a	a	a	a	a	a	a
AE 0.8	3	a	b	b	a	a	a	a
AE 0.4	3	a	b	b	b	a	a	a
CONTROL	3	a	c	c	c	b	b	b

